



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias.

**El factor PIF4 es un integrador
de las señales de
brassinosteroides (BR) y
giberelinas (GA)**

TESIS DOCTORAL
Stella Bernardo García

Madrid 2014.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias.

**El factor PIF4 es un integrador
de las señales de
brassinosteroides (BR) y
giberelinas (GA)**

TESIS DOCTORAL
Stella Bernardo García

DIRECTORES
Salomé Prat Monguió

Madrid 2014.



El factor PIF4 es un integrador de las señales de brassinosteroides (BR) y giberelinas (GA)

Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias por:

Stella Bernardo García

Universidad Autónoma de Madrid
Mayo 2014

Vº Bº del Tutor:

Dr. Rafael Rivilla Palma

Vº Bº de los Directores:

Dra. Salomé Prat Monguió

AGRADECIMIENTOS

Gracias Salomé, por permitirme realizar la tesis en tu laboratorio, por toda la ayuda, los consejos y el apoyo.

Me gustaría agradecer especialmente a Miguel de Lucas, Cristina Martínez y Ana Espinosa, sin ellos este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias al 314, Abe, Cristina Nieto, Edu, Pilar, Carlos, Vadir, Marisa y el resto de personas que han pasado por el lab, Imán, Rafa, Manel... Gracias por los momentos, los consejos, las discusiones y la ayuda. Gracias a GMP, in vitro, invernadero, confocal....

Gracias Lauri, Elisa e Isa!

Gracias a mi familia, mis padres Juvenal y Ana y mi tía Paci por contagiarme el gusto por la Biología y mucho más, a mis abuelitos por todo el cariño, a mis hermanas por su apoyo, Jani mi alegría y especialmente a Noeli por estos años compartiendo y animándome. Gracias Aitziber, por el apoyo, las discusiones sobre ciencia y por hacerme creer en mi misma. ★★



RESUMEN

El crecimiento de las plantas está regulado por las condiciones ambientales, y principalmente por cambios en las condiciones de luz y temperatura. La luz afecta a casi todas las etapas del desarrollo de la planta, además, aporta información clave relativa a su entorno más cercano. La acción coordinada de la luz, la temperatura, el reloj interno y las hormonas giberelinas (GA) y brasinosteroides (BR) modula el tamaño final de sus diferentes órganos y determina diferentes procesos de desarrollo, al controlar la expresión de un gran número de genes implicados en la expansión de la pared celular y en la señalización por auxinas. Los factores *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR* (PIFs) han mostrado ejercer un papel central en la elongación del hipocotilo y actuar como integradores de todas estas señales. Estos factores unen elementos G-box y E-box en los promotores de genes implicados en la remodelación de la pared celular y en la síntesis y señalización de auxinas, activando su transcripción (Castillon et al., 2007). La luz regula la estabilidad de los PIFs, al inducir su interacción con la forma fotoactiva de PHYB, que promueve su fosforilación y degradación por el sistema proteasoma (Castillon et al., 2007). La ruta de señalización de GA ejerce un papel clave en la función de estos factores, ya que se ha demostrado que los represores DELLA se unen a su dominio bHLH y bloquean su unión al ADN (de Lucas et al., 2008). Recientemente se ha establecido que los PIFs están co-activados por los factores BES1 y BZR1, lo que destaca un papel adicional de estos factores en la integración de la señal de BRs (Oh et al., 2012). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la interacción de las rutas de señalización de GAs y BRs, no han sido aún resueltos en su totalidad. La aplicación de BL recupera el fenotipo enano de los mutantes deficientes o insensibles a GAs, además, es necesaria una ruta activa de señalización de BRs para una respuesta correcta a la aplicación de GAs. Curiosamente, los BRs no afectan la estabilidad de las proteínas DELLA, ya que en mutantes deficientes en BRs, estos represores se degradan tras la aplicación de GAs igual que en las plantas silvestres. Sin embargo, estos mutantes muestran un fenotipo enano después de la aplicación de GAs, lo que indicaría que las rutas de señalización de GAs y BRs convergen por debajo de las DELLAs. En este trabajo, mostramos que el enzima GSK3 quinasa BIN2, al fosforilar los factores BES1 y BZR1, promoviendo su exclusión del núcleo y degradación, es también capaz de interaccionar con PIF4. Demostramos que PIF4 es una diana de fosforilación de BIN2, y que esta modificación marca a la proteína PIF4 para su degradación por el proteasoma. Generamos una variante de este factor, la proteína PIF1A, en la cual eliminamos uno de los motivos consenso de fosforilación de BIN2. Mostramos que la eliminación de este dominio provoca una fuerte estabilización de la proteína PIF4, y que la expresión de PIF41A causa un fenotipo caracterizado por una floración extremadamente temprana y crecimiento muy alargado, debido a la sobre-activación de sus genes diana. Sin embargo, la proteína PIF41A no es capaz de recuperar el fenotipo enano de plantas mutantes *bin2-1*, debido a una activación constitutiva de la quinasa BIN2.

Dado que se ha establecido que los factores BES1 y BZR1 actúan como co-activadores de los factores PIFs, es posible que la mutación PIF41A no sea capaz de recuperar el fenotipo mutante *bin2-1* debido a que esta quinasa sigue fosforilando a los factores BES1 y BZR1. Los mutantes *bes1-D* y *bzr1-1D* muestran una respuesta constitutiva a BRs. Se ha visto que los factores PIFs son necesarios para la respuesta constitutiva a BRs de estos mutantes (Oh et al., 2012), lo que indicaría que la acción concertada de estas dos familias de reguladores transcripcionales es esencial para promover elongación celular. En este estudio demostramos que los mutantes *bes1-D* muestran aún una inhibición en el crecimiento del hipocotilo en presencia del inhibidor BRZ en luz, y que la expresión conjunta de *PIF41A* y *bes1-D* conduce a una respuesta totalmente insensible a BRZ y la activación de los genes diana, incluso en presencia de este inhibidor. Estas plantas se caracterizan además por presentar un crecimiento continuado tanto en el día como en la noche, al contrario que las plantas silvestres en las cuales el hipocotilo crece sólo al final de la noche. En estudios en los que se comparó la estabilidad de las proteínas PIF4 y PIF41A, observamos que PIF41A se estabiliza preferentemente al amanecer, coincidiendo con el máximo crecimiento del hipocotilo, y que si bien la aplicación de BL o BRZ modifican la estabilidad de la proteína silvestre PIF4, PIF41A muestra niveles similares de acumulación en ambos tratamientos.

En conjunto, estos resultados revelan un nuevo mecanismo de acción de los BRs, por el cual estas hormonas actúan de forma antagónica a la señalización por luz, inhibiendo la desestabilización del factor PIF4 mediada por la quinasa BIN2. Esta regulación sería especialmente relevante en el control de la elongación del hipocotilo al final de la noche, antes de la luz active a PHYB y la acumulación de las DELLAs limite la actividad transcripcional de PIF4.

SUMMARY

Plant growth is regulated by environmental conditions, mostly by changes in light and temperature. Light affects almost every aspect of plant development and physiology, as it provides the energy required for photo-assimilation, in addition to serve as an informational cue of the environment in which the plant grows. Coordinated action of light, temperature, the endogenous clock and the hormones gibberellins (GA) and brassinosteroids (BR) control the size of the various plant organs and trigger different developmental processes, by affecting the expression of genes involved in cell wall loosening and auxin regulation. The *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* (PIFs) showed to play a central role in hypocotyl elongation, by integrating all of these signals. These transcription factors bind G-box and E-box elements in the promoters of diverse cell wall-remodelling and auxin synthesis and signalling genes, to activate their transcription (Castillon et al., 2007). Light regulates PIFs activity, by inducing their interaction with photoactivated PHYB, which triggers phosphorylation of these factors and marks them for proteasomal degradation (Castillon et al., 2007). GA signalling plays an important role in the PIFs regulation, as DELLA repressors were found to bind the bHLH domain of these factors and block their DNA recognition ability (de Lucas et al., 2008). More recent findings established that PIFs are co-activated by the BES1 and BZR1 factors, with a central role in BRs signalling, highlighting an additional role of these regulators in BR signal integration. PIFs act in a concerted manner with BES1/BZR1 factors to activate the expression of different genes regulated by BR (Oh et al., 2012). However, the molecular mechanisms involved in cross-talk regulation of the GA and BRs pathways remain to be fully solved.

The application of BL rescues the dwarf phenotype of GA-deficient and insensitive mutants and an active BR pathway is essential for GA-promotion of hypocotyl growth. Interestingly, BRs do not affect stability of the DELLA proteins, as these repressors were shown to be equally destabilized by GAs in BR-deficient mutants as in the wild-type. However, these mutants still exhibit a dwarf phenotype after GA application, suggesting that cross-talk between these hormones occurs downstream of the DELLAs. In this work, we show that PIF4 binds the GSK3 kinase BIN2. We demonstrate that PIF4 is phosphorylated by BIN2. We generated a mutant of this factor, the PIF41A protein, in which we eliminated one of the phosphorylation consensus of BIN2. We show that mutation of this domain leads to strong stabilization of the protein and that expression of PIF41A causes an extremely early and severe elongated phenotype, due to up-regulated levels of expression of its gene targets. However, this protein showed to be unable to suppress the dwarf phenotype of *bin2-1* mutant seedlings, with a constitutive activation of the kinase BIN2.

Given that the BES1 and BZR1 factors were established to act as co-activators of PIFs (Oh et al., 2012), it was plausible that PIF41A does not suppress the dwarf phenotype of *bin2-1* mutants. The *bes1-D* and *bzr1-1D* mutants display a constitutive response to BRs. We show that the *bes1-D* mutants are not insensitive to the inhibitor BRZ in the light, but display a reduction in hypocotyl growth, and that expression of PIF41A and *bes1-D* leads to a fully insensitive response to BRZ and up-regulated expression of their gene targets in the presence of this inhibitor. These plants are in addition characterized by showing a continuous growth during day and night; in opposite to the wild-type that shows maximal growth at dawn (Nozue et al., 2007). In studies where we compared stability of the PIF4 and PIF41A proteins, we observed that PIF41A is preferentially stabilized at dawn, coinciding with the interval of maximal hypocotyl growth, and that application of BL or BRZ modified the stability of the wild-type PIF4 protein, but did not affect PIF41A protein levels.

Altogether, these results reveal a novel mechanism of action of BRs in antagonizing light signalling, by inhibiting BIN2-mediated destabilization of PIF4 factor. This regulation seems to play a prevalent role in timing hypocotyl elongation to late night, before light activation of PHYB and accumulation of DELLAs restrict PIF4 transcriptional activity.

ÍNDICE

RESUMEN	9
SUMMARY	11
ABREVIATURAS	16
INTRODUCCIÓN	18
LA LUZ, FUENTE VITAL PARA LAS PLANTAS	19
FOTORRECEPTORES DE PLANTAS	20
LUZ UV-B	20
LUZ UV-A/AZUL	20
LUZ ROJA/ROJA LEJANA	21
FACTORES QUE INTERACCIONAN CON LOS FITOCROMOS: PIFs	23
LA LUZ ANTAGONIZA LA FUNCIÓN DE LOS FACTORES PIFs	25
GIBERELINAS	27
LAS PROTEÍNAS DELLA, PRINCIPALES REPRESORES DE LA RUTA DE GA	28
PERCEPCIÓN DE LAS GAS	29
MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES REGULADOS POR LAS PROTEÍNAS DELLA	30
BRASINOSTEROIDES	31
METABOLISMO DE LOS BR	32
TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL DE BRs	35
LAS GSK3 QUINASAS	37
MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES REGULADOS POR BR	38
RELACIÓN ENTRE LAS RUTAS SEÑALIZACIÓN DE BR Y GA	39
OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	43
MÉTODOS DE CLONAJE	43
CONSTRUCCIONES REALIZADAS PARA VECTORES DE EXPRESIÓN EN PLANTA Y EN LEVADURA	44
MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	46
TRATAMIENTO CON LA FOSFATASA CIP (CALF INTESTINAL PHOSPHATASE)	47

LONGITUD DE LOS HIPOCOTILOS	47
LÍNEAS TRANSGÉNICAS GENERADAS Y MUTANTES	48
EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	49
ENSAYOS IN VITRO QUINASA Y DE FOSFORILACIÓN	49
TNT Y ENSAYOS IN VITRO GST-PULL-DOWN	50
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT	50
EXPRESIÓN TRANSITORIA EN HOJAS DE <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	51
COINMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS (COIP)	51
ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN BIMOLECULAR FLUORESCENTE (BIFC)	52
ENSAYO DE ACTIVIDAD LUCIFERASA	52
ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO (YTH)	53
MICROSCOPIA CONFOCAL	53
EXTRACCIÓN DE ARN Y QRT	54
ANÁLISIS DE MICROMATRICES	54
RESULTADOS	56
LAS PLANTAS NECESITAN UNA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE BRs ACTIVA PARA RESPONDER CORRECTAMENTE A GA	56
LOS BRs PROMUEVEN LA ACUMULACIÓN DE UNA FORMA DE PIF4 CON MAYOR MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA	60
LAS LÍNEAS SOBRE-EXPRESORAS DE PIF4 MUESTRAN UNA RESPUESTA HIPOSENSIBLE A BRZ Y NIVELES ALTOS DE EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR BR	61
INTERACCIÓN DE PIF4 CON LA QUINASA BIN2	64
PIF4 INTERACCIONA CON BIN2 EN ENSAYOS IN VITRO: YTH Y PULL-DOWN	64
PIF4 INTERACCIONA CON BIN2 EN ENSAYOS IN VIVO: COIP Y BIFC	66
BIN2 FOSFORILA A PIF4 IN VITRO	68
BIN2 REGULA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE PIF4	69
LA MUTACIÓN DE UNO DE LOS MOTIVOS CONSENSO DE FOSFORILACIÓN DE BIN2 EN LA PROTEÍNA PIF4 INDUCE UNA FUERTE ESTABILIZACIÓN DE ESTE FACTOR	70
LA EXPRESIÓN DE PIF41A SUPRIME PARCIALMENTE EL FENOTIPO ENANO DE LOS MUTANTES <i>BIN2-1</i>	77
LA FOSFORILACIÓN DE BIN2 EJERCE UN PAPEL FUNDAMENTAL EN LA DESESTABILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA PIF4 AL AMANECER	79
LAS PLANTAS PIF41A<i>BES1-D</i> SON INSENSIBLES A BRZ EN LUZ	85
DISCUSIÓN	88

ÍNDICE

INTERACCIÓN ENTRE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN GA Y BR	89
PIF4 ACTÚA COMO INTEGRADOR DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN GA Y BR	90
LOS BRs MODULAN LA ESTABILIDAD DEL FACTOR PIF4	91
LA FORMA NO FOSFORILABLE DE PIF4 Y LOS FACTORES BES1/BZR1 SON NECESARIOS PARA LA ELONGACIÓN CELULAR	92
LA ACCIÓN CONJUNTA DE LOS PIFs CON BES1/BZR1 MODULAN EL PATRÓN DIURNO DE CRECIMIENTO DEL HIPOCOTILO	93
CONCLUSIONES	96
BIBLIOGRAFÍA	98

ABREVIATURAS

Amp+: resistencia a ampicilina

BES1: BRI1-EMS-SUPPRESSOR1

bHLH: basic hélix loop hélix

BiFC: Complementación fluorescente bimolecular

BL: brasinólido

BR: brasinosteroides

BRZ: brasinazol

BZR1: BRASSINAZOLE RESISTANT1

CHX: cicloheximida

Col-0: ecotipo Columbia-0

CRY1-2: Criptocromo 1 y 2

FT: FLOWERING LOCUS T

GA: Gibberellin

GAI: GA Insensitive

GID1: GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1

Kan+: resistencia Kanamicina

Ler: ecotipo Landsberg erecta

LOV: Light Oxygen Voltage

LUC: Luciferasa

Pfr: forma activa del fitocromo que absorbe luz roja lejana

PHOT1-2: PHOTOTROPINS

PHYA-E: PHYTOCHROMES

PIF1-7: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS

PIL1: PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3-LIKE1

ABREVIATURAS

PP2A: PROTEIN PHOSPHATASE 2A

Pr: forma no activa del fitocromo que absorbe luz roja

qPCR: quantitative polymerase chain reaction

RGA: REPRESSOR OF *gai1.3*

RGL1: RGA like 1

RGL2: RGA like 2

RGL3: RGA like 3

RL: Red light

RPT5: 26S PROTEASOME AAA-ATPASE SUBUNIT

SCF^{SLY}: E3 Ubiquitin ligase complex (Skip1, Cullin, F-box)

Spe+: resistencia espectinomicina

UVR8: UVB RESISTANCE 8

XTR7: XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLYCOSYLASE 7

ZT: *Zeitgeber* time or lights-on signal

ZTL: ZEITLUPE

INTRODUCCIÓN

Las plantas, al ser organismos sésiles, se enfrentan a multitud de condiciones adversas, que limitan su desarrollo y crecimiento. Por ello, han desarrollado mecanismos complejos de regulación que les permiten adaptar a lo largo de su ciclo de vida el crecimiento de sus diferentes órganos o el tiempo de floración, en función de las condiciones externas. De este modo, son capaces de sobrevivir en condiciones ambientales extremas y defenderse frente al ataque de insectos herbívoros o distintos tipos de organismos patógenos.

Variaciones en el espectro e intensidad de la luz incidente, en la temperatura, la disponibilidad de agua o el aporte de nutrientes en el suelo, afectan de manera notable el desarrollo y porte de la planta, y determinan el rendimiento de la cosecha en los cultivos de explotación. La luz es uno de los factores ambientales que más afectan su desarrollo, dado que provee la energía necesaria para la fotosíntesis y sirve como fuente de información de los cambios estacionales o de la presencia próxima de otras plantas. Cambios en las condiciones de luz, de hecho, afectan prácticamente todas las fases de desarrollo de la planta, desde la germinación de la semilla, hasta la floración y desarrollo del fruto. En ausencia de luz, los brotes inician también un desarrollo etiolado, caracterizado por una rápida elongación del hipocotilo o tallo embrionario, con el fin de alcanzar la superficie del suelo. La luz hace que el crecimiento del hipocotilo se detenga, los cotiledones se expanden y se inicia la formación de hojas verdaderas, lo que permite a la plántula utilizar la luz en la fotosíntesis e iniciar un crecimiento auxotrófico.

Las plantas integran la señal derivada de la presencia o ausencia de luz, con sus propios programas de desarrollo, regulados por distintas rutas hormonales. De este modo, todas estas rutas controlan de manera conjunta los cambios en expresión génica que finalmente determinan el crecimiento coordinado de sus órganos o la transición entre las diferentes fases de desarrollo. A su vez, cambios en los niveles endógenos de hormonas influyen en la respuesta de la planta a distintas condiciones de luz.

El llegar a comprender cómo estos procesos se integran y regulan es uno de los mayores retos de la biología molecular de plantas, ya que un conocimiento detallado de estas rutas hará posible seleccionar nuevas variedades capaces de adaptarse a un amplio rango de condiciones exógenas, sin que se vea afectada su producción. En este trabajo se han estudiado los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la actividad del factor PIF4, con un papel central en elongación celular, en respuesta tanto a señales externas como endógenas de la planta, en concreto la luz y las hormonas giberelinas (GAs) y brasinosteroides (BRs). Aunque este

factor fue inicialmente identificado como un regulador de la ruta de señalización de fitocromo, es evidente que actúa también como un integrador de las rutas de GAs y BRs, y ejerce un papel principal en el control de la elongación del hipocotilo tras la germinación.

La luz, fuente vital para las plantas

La luz aporta la energía necesaria para la fotosíntesis y como tal afecta todos los procesos metabólicos de la planta. Además, sirve como una importante fuente de información del entorno donde la planta crece, lo que le permite adaptar su desarrollo a la estación del año y latitud terrestre, o a la presencia de otros competidores. Las plantas, a lo largo de la evolución, han desarrollado diferentes familias de fotorreceptores que les permiten detectar la presencia o ausencia de luz, su duración, intensidad y longitud de onda. Estos fotorreceptores absorben la radiación solar en un espectro lumínico que abarca desde 280 nm (ultravioleta) a 800 nm (rojo lejano) y son capaces de inducir distintas respuestas según la región específica del espectro lumínico (Figura 1).

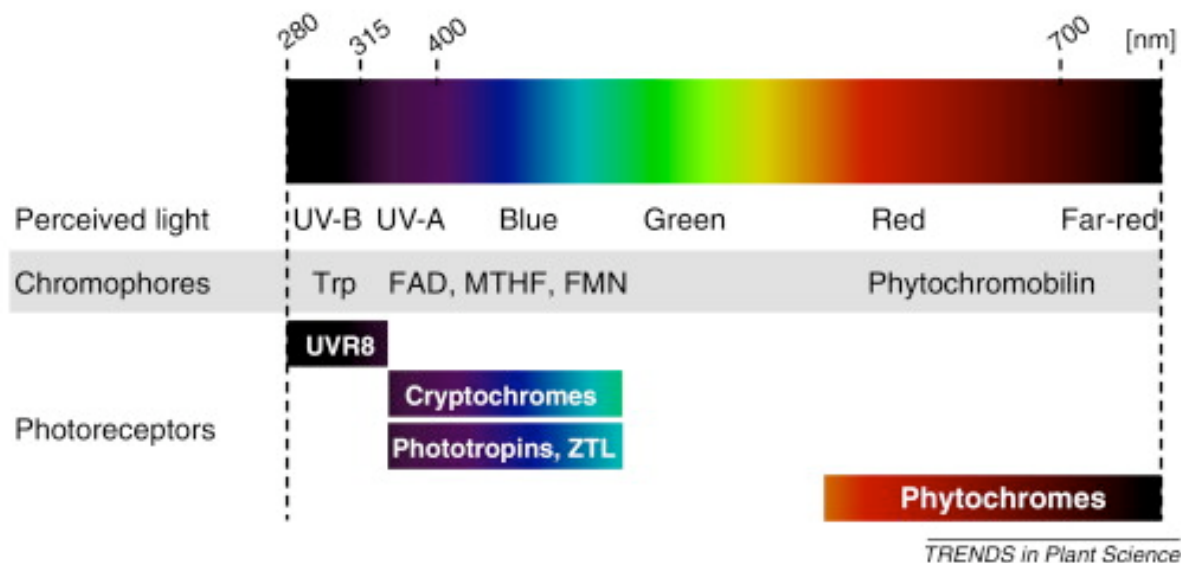


Figura 1. Percepción de la luz mediada por los distintos fotorreceptores de plantas. Los fotorreceptores de plantas reciben información del espectro lumínico. El receptor UVR8 es el único receptor de luz UV-B identificado hasta ahora. Varias proteínas con cromóforos en su estructura son capaces de absorber la luz UV-A/Azul. Los criptocromos se unen a los cromóforos FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) y MTHF (methenyltetrahydrofolate) (Leivar and Quail, 2011; Liu et al., 2011). Las fototropinas y las proteínas Zeitrlope (ZTL) se unen al cromóforo FMN (Flavin Mononucleotide) a través de los dominios LOV (Light, Oxygen or Voltage). Los fitocromos son fotorreceptores que perciben la luz roja/rojo-lejana, aunque también están implicados en alguna respuesta a luz azul. Estos receptores muestran cromóforos de tipo fitocromobilina, un tetrapirrol lineal (Kami et al., 2010).

Fotorreceptores de plantas

En *Arabidopsis* se han identificado cinco tipos distintos de fotorreceptores: los *CRİPTOCROMOS*, las *FOTOTROPINAS* y los miembros de la familia *ZEITLUPE*, que perciben luz azul, los *FİTOCROMOS* que perciben la luz roja/roja lejana y el fotorreceptor de UV-B *UVR8* (*UV RESISTANCE LOCUS 8*) (Kami et al., 2010; Liu et al., 2011; Rizzini et al., 2011) (Figura 1). Estos fotorreceptores regulan diferentes procesos como son la de-etiolación, el fototropismo, la respuesta de huida de la sombra o “*shade avoidance*”, la apertura de estomas y la localización intracelular de los cloroplastos, en respuesta a intensidades elevadas o bajas de luz. De forma indirecta, la luz optimiza también el crecimiento de la planta y su éxito reproductivo, al regular el reloj circadiano y la germinación, y controlar el tiempo de floración (Arsovski et al., 2012; Kami et al., 2010; Sullivan and Deng, 2003).

Luz UV-B

La radiación ultravioleta B (UV-B, 280-315nm) es percibida por el fotorreceptor UVR8 (*UV RESISTANCE LOCUS 8*) (Favory et al., 2009), el cuál se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo y se expresa constitutivamente en todos los tejidos de la planta. Este fotorreceptor se acumula como homodímero en presencia de luz que carece de UV-B, y se monomeriza rápidamente al ser expuesto a luz UV-B. Este proceso depende de un triptófano intrínseco que funciona a modo de cromóforo de UV-B (Rizzini et al., 2011). El monómero UVR8 se revierte rápidamente a su forma dimérica en oscuridad (Heilmann and Jenkins, 2013), condición en la que se favorece el crecimiento del hipocotilo.

Luz UV-A/Azul

La radiación ultravioleta A/Azul (UV-A, 320-500 nm) es percibida por tres clases de fotorreceptores: los criptocromos (CRY1, CRY2), las fototropinas (PHOT1, PHOT2) y las proteínas con dominos LOV/F-box/Kelch (ZTL,FKF y LKP2) (Christie, 2007).

Los criptocromos (CRY1, CRY2) son flavoproteínas que cuentan con dos tipos de cromóforos en su extremo N-terminal: pterina y FAD (Flavin Adenine Dinucleotide). El extremo carboxi-terminal de CRY1 y CRY2 cuenta con una extensión variable esencial para la función de CRY (Yang et al., 2000). La transcripción de CRY1 y CRY2 esta regulada por el reloj circadiano. La localización intracelular de ambos criptocromos es mayoritariamente nuclear: CRY2 se localiza constitutivamente en el núcleo, mientras que CRY1 se encuentra principalmente en el núcleo en oscuridad. La luz no afecta a la estabilidad de CRY1, pero sí a la de CRY2 que se degrada rápidamente en luz azul. Los criptocromos inhiben el crecimiento del hipocotilo y regulan la expresión de genes activados por la luz (Wang et al., 2001a; Yang et al., 2001), además regulan

otras respuestas fotomorfogénicas como son: expansión de los cotiledones, diferenciación de los cloroplastos, control fotoperiódico de la floración, etc. (Yu et al., 2010).

Las proteínas con dominios LOV/F-box/Kelch y las fototropinas tienen dos cromóforos FMN (Flavin Mononucleotide) asociados a LOV (Light, Oxygen, Voltage) en el extremo amino-terminal de la proteína. Estas proteínas regulan la respuesta fotoperiódica de floración y distintos componentes del reloj circadiano (Ito et al., 2012).

Las fototropinas (PHOT1 y PHOT2) son también flavoproteínas. PHOT1 y PHOT2 son receptores quinasa sensibles a la luz azul cuyo extremo C-terminal contiene un dominio Ser/Thr quinasa clásico. Además de regular el fototropismo de tallos y raíces, las fototropinas controlan otras respuestas como el movimiento de cloroplastos (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001; Sakai et al., 2001) y la apertura de los estomas (Christie, 2007; Kinoshita et al., 2001).

Luz roja/roja lejana

La luz roja/roja lejana (600-800 nm) es percibida por los fotorreceptores fitocromos, que en *Arabidopsis* están codificados por cinco genes distintos (PHYA-PHYE). PHYA es más abundante en oscuridad y se degrada rápidamente en luz, el resto de fitocromos son estables en luz (Franklin and Quail, 2010; Sharrock and Clack, 2002). Los fitocromos son holoproteínas que incorporan cofactores derivados de la bilina, un tetrapirrol de cadena lineal. Tienen dos dominios: un dominio N-terminal fotosensible y responsable de la señalización, que a su vez incluye varios subdominios conservados: PAS (Per-Arnt-Sim), GAF y PHY y un dominio C-terminal responsable de la dimerización y localización, que incluye el dominio HKRD (Histidine Kinase-Related Domain) (Fankhauser and Chen, 2008; Li et al., 2011; Nagatani, 2010; Rockwell et al., 2006; Uliasz et al., 2010) (Figura 2).

Los fitocromos oscilan entre dos formas relativamente estables, la forma inactiva Pr que absorbe luz roja (660 nm) y la forma activa Pfr que absorbe luz roja lejana (730 nm) (Rockwell et al., 2006; Sharrock and Clack, 2004). El cambio de estado entre estas dos formas es reversible y depende del cromóforo que se encuentra unido al extremo N-terminal, en la región GAF (Li et al., 2011; Nagatani, 2010). En la luz, el cromóforo de bilina (fitocromobilina, P₆₆₀B) cambia su conformación e induce a su vez un cambio de conformación en la proteína (Figura 2). Una vez fotoactivados, los fitocromos fotoactivados son translocados del citosol al núcleo (Nagatani, 2010), donde se localizan en cuerpos nucleares o “*speckles*” (Kircher et al., 1999) y regulan la expresión génica a través de la interacción directa con factores específicos de transcripción (Quail, 2002).

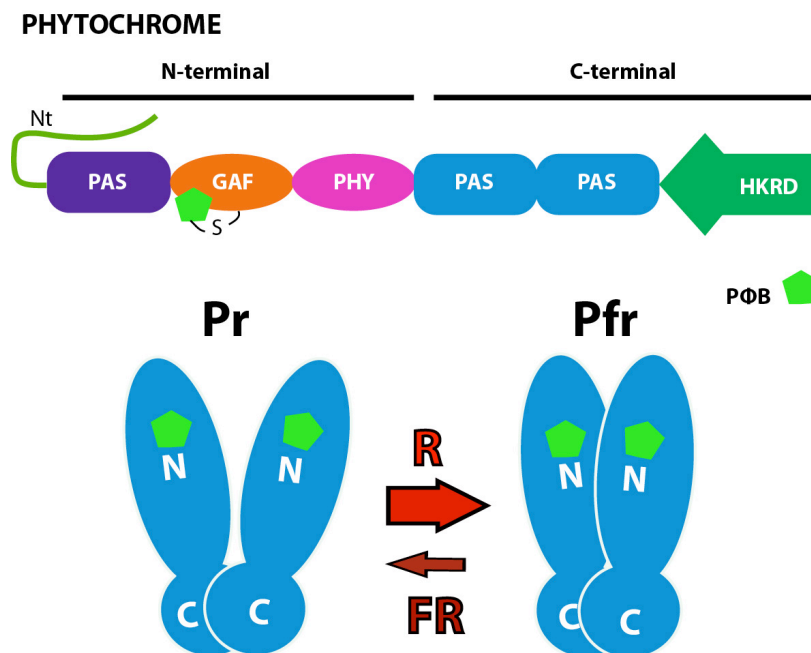


Figura 2. Representación esquemática del Fitocromo. Los fitocromos tienen dos dominios diferenciados: un dominio N-terminal fotosensible que incluye los subdominios PAS (Per-Arnt-Sim), GAF y PHY; y un dominio C-terminal con el dominio HKRD (histidine kinase-related domain). Los fitocromos forman dímeros y cambian de conformación en respuesta a distintos tipo de luz: la forma inactiva Pr absorbe luz roja y la forma activa Pfr absorbe luz roja lejana (Sharrock and Clack, 2004). Adaptado de (Leivar and Quail, 2011; Nagatani, 2010).

En *Arabidopsis*, la familia de fitocromos está constituida por cinco miembros, PHYA a PHYE, capaces de formar algunos de ellos homo- y heterodímeros (Clack et al., 2009). PHYA y PHYB son los fitocromos más abundantes y ejercen un papel principal en el control de casi todos los procesos de desarrollo y crecimiento de la planta regulados por luz (Franklin and Quail, 2010; Kami et al., 2010). Mientras que PHYA es rápidamente degradado en la luz (tipo I), PHYB es mucho más estable (tipo II). Esta diferencia en estabilidad fotoquímica, hace que ambos fitocromos regulen en parte las mismas respuestas, pero también respuestas diferentes, específicas de cada una de estas proteínas. Las proteínas PHYA se acumulan en la noche y en luz roja lejana, pero son rápidamente degradadas en luz roja (Clough, 1997). PHYA ejerce un papel fundamental en luz roja lejana, así como en la transición de oscuridad a luz. Sin embargo, PHYB al ser más estable, tiene una función principal tras una exposición prolongada a luz roja. La caracterización del mutante quíntuple de fitocromo demostró que estos fotoreceptores no son necesarios para completar el ciclo de vida de las plantas. Estos mutantes son completamente viables aunque no son capaces de responder a luz roja (Hu et al., 2013; Strasser et al., 2010). Las semillas de estas plantas, sin embargo, necesitan de la aplicación exógena de giberelinas (GA) para que germinen. Por otra parte, una pérdida de función en el gen *FT* (*Flowering Locus T*)

mejora la germinación y evita que las plantas florezcan de forma temprana (Chiang et al., 2009). En estas semillas la luz no induce la germinación y no parecen existir otros receptores que sustituyan la función de los fitocromos. El hecho de que una aplicación exógena de GAs rompa la dormición de estas semillas, indica que en semillas silvestres la luz promueve la germinación debido a que induce la síntesis de GAs, a través de una ruta de señalización mediada por fitocromo (Yamaguchi et al., 1998).

Factores que interaccionan con los fitocromos: PIFs

La percepción de la luz por los fitocromos desencadena un proceso de señalización intracelular que se traduce en un cambio en los niveles de expresión, prácticamente una tercera parte de los genes de la planta se ven afectados (Rockwell et al., 2006). Este proceso de transducción depende de la translocación de la forma activa del fitocromo (Pfr) del citoplasma al núcleo, donde interacciona con diferentes reguladores transcripcionales, de los cuales los mejor caracterizados son una familia de factores de transcripción tipo bHLH (*basic helix-loop-helix*), conocidos como *PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS* (PIFs) (Li et al., 2011) (Figura 3). Estos factores promueven el crecimiento etiolado de los brotes recién germinados y ejercen un papel central en el control del crecimiento y elongación de la planta (Castillon et al., 2007; Leivar and Quail, 2011).

Los PIFs son factores de transcripción que pertenecen al subgrupo 15 de la familia bHLH de *Arabidopsis* (Toledo-Ortiz et al., 2003). Cuentan con un dominio de localización nuclear (Bauer et al., 2004; Huq et al., 2004; Huq and Quail, 2002; Leivar et al., 2008; Ni et al., 1998; Oh et al., 2004) y comparten la mayoría de ellos un dominio APB (*active PHYB binding*) en el extremo N-terminal, necesario para la interacción con fitocromo B (phyB) (Khanna et al., 2004; Leivar and Quail, 2011) (Figura 3). La unión a phyB provoca la fosforilación de estos factores y la desestabilización de la proteína en luz. Los PIFs se unen de forma específica a motivos G-box (CACGTG) y E-box (CANNTG) en los promotores de los genes que regulan (de Lucas et al., 2008; Hornitschek et al., 2009; Huq and Quail, 2002; Leivar et al., 2008; Martinez-Garcia et al., 2000). En un principio se pensaba que estos factores de transcripción actuaban como reguladores negativos de phyB, pero ahora se sabe que promueven la elongación celular (excepto PIF7) en oscuridad o en luz enriquecida en la fracción rojo lejano, siendo rápidamente degradados en luz.

La luz promueve que la forma Pfr activa del fitocromo Pfr migre al núcleo (Chen et al., 2004; Fankhauser and Chen, 2008; Yamaguchi et al., 1999). En lo que se refiere a phyB, tanto la luz roja, como en menor medida la luz azul continua, inducen la migración de la proteína al núcleo. phyA, por el contrario, es importado al núcleo tras un pulso corto de luz roja, roja lejano o azul. En el núcleo, ambos fotoreceptores se localizan en *speckles* o cuerpos nucleares, también conocidos

como *photobodies* (Van Buskirk et al., 2012). phyB forma dos tipos de cuerpos nucleares: los *photobodies* tempranos, que se forman 15 min después de la exposición a la luz y co-localizan con los PIFs, y los *photobodies* tardíos, más grandes y estables, que aparecen después de exposiciones largas a luz roja (2-3 h), una vez los PIFs se han degradado (Bauer et al., 2004). El transporte de los fitocromos del citoplasma al núcleo y la formación de cuerpos nucleares, es uno de los primeros eventos que se observan en la célula, tras la exposición a la luz. Se ha visto que la proteína HEMERA co-localiza con los fitocromos y PIFs en los cuerpos nucleares y que es esencial para la degradación de PHYA, PIF1 y PIF3 en la luz, lo que indicaría que los *photobodies* corresponden a sitios de degradación de estas proteínas (Chen et al., 2010).

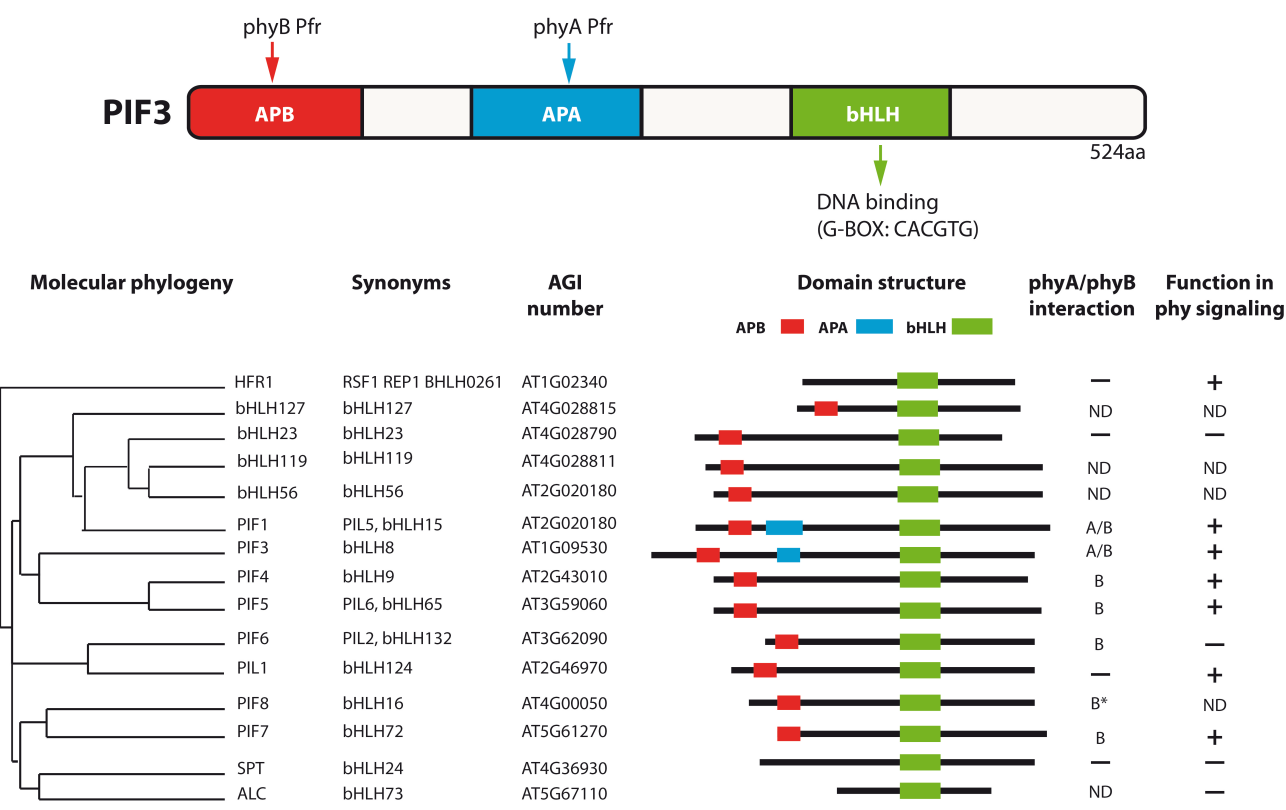


Figura 3. Factores que interaccionan con los fitocromos. Los PIFs son factores de transcripción que pertenecen al subgrupo 15 de la familia bHLH de *Arabidopsis*. Se caracterizan por contener un dominio de unión a ADN (bHLH) y un dominio de unión a fitocromo B (APB). PIF1 y PIF3 tienen un dominio adicional APA (*active PHYA binding*) responsable de la unión a fitocromo A (phyA) (Khanna et al., 2004; Leivar and Quail, 2011). Adaptado de (Leivar and Quail, 2011).

La interacción entre la forma Pfr activa y los PIFs no solo induce la rápida degradación de los PIFs, sino que también provoca una lenta reducción de los niveles de phyB en condiciones prolongadas de luz (Al-Sady et al., 2008; Khanna et al., 2007; Leivar et al., 2008; Monte et al., 2004). Los PIFs intervienen en este tipo de retro-regulación, promoviendo la unión de phyB a

COP1, una E3 ligasa implicada en ubiquitinar el conjunto de moléculas phyB fotoactivas que se encuentran en el núcleo y marcarlas para su degradación por el proteasoma (Jang et al., 2010).

La unión de phyB a los PIFs, a su vez, provoca la fosforilación de estas proteínas, siendo suficientes 10 min de exposición a luz roja para que PIF3 se fosforile (Bauer et al., 2004). Dicha modificación es también uno de los eventos más tempranos inducidos por los fitocromos, y viene seguida de la poliubiquitinación y consecuente degradación de estas proteínas por el sistema proteasoma (Al-Sady et al., 2006; Leivar et al., 2008; Shen et al., 2008). Se ha establecido que PIF3 se fosforila en luz roja en al menos 10 residuos Serina/Treonina (S/T) (Ni et al., 2013), y que estas fosforilaciones en su conjunto contribuyen a que la proteína se ubiquitine y sea rápidamente degradada. Además, parece que phyB impide la unión de los PIFs a los promotores de sus genes diana (Park et al., 2012).

La región bHLH de los PIFs, además de permitir la unión al ADN (dominio básico), favorece la formación de homodímeros y/o heterodímeros (dominio HLH) entre estas proteínas. Algunos de los factores PIFs pueden formar heterodímeros con varios miembros de la familia. Así por ejemplo, PIF3 forma homodímeros, pero es también capaz de heterodimerizar con PIF4 (Al-Sady et al., 2008; Bu et al., 2011; Shen et al., 2008; Toledo-Ortiz et al., 2003) y con HFR1, un factor HLH atípico, que carece de un dominio básico de unión al ADN y forma heterodímeros inactivos con los otros miembros de la familia, ejerciendo una función positiva en la señalización de luz azul y luz roja lejana (Duek and Fankhauser, 2003; Fairchild et al., 2000).

La luz antagoniza la función de los factores PIFs

Los PIFs promueven el desarrollo etiolado de la planta, al activar la transcripción de numerosos genes implicados en la remodelación de la pared celular y en la síntesis y señalización de auxinas, con un papel central en la expansión celular. Tras la germinación, las plántulas o brotes jóvenes pueden seguir dos patrones de desarrollo diferentes: en oscuridad, muestran un crecimiento etiolado, conocido como escotomorfogénesis, que se caracteriza por un rápido crecimiento del hipocotilo, y por que los cotiledones permanecen cerrados, son de color amarillo pálido debido a la ausencia de clorofila y forman un gancho apical que se encarga de proteger al meristemo cuando la plántula se abre paso bajo tierra. La luz induce un patrón de desarrollo conocido como fotomorfogénesis, caracterizado por una interrupción en el crecimiento del hipocotilo, la apertura y expansión de los cotiledones, y la activación del meristemo a fin de formar nuevas hojas. Los cloroplastos se diferencian y los cotiledones y hojas adquieren un color verde intenso debido a la acumulación de clorofila, cambios morfológicos que se ven acompañados por una masiva reorganización en el patrón de expresión de genes nucleares y cloroplásticos, estos últimos con función en la fotosíntesis (Fankhauser and Chory, 1997) (Figura 11).

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los mutantes de PIF presentan un fenotipo parcialmente de-etiolado en oscuridad (hipocotilos cortos, cotiledones abiertos y acumulación de precursores de clorofila), mientras que la sobre-expresión de estos factores causa un fenotipo etiolado en la luz (hipocotilos alargados, alteraciones en el crecimiento gravitrópico negativo, cotiledones parcialmente cerrados, permanece el gancho apical y la biosíntesis de la clorofila está inhibida). Por lo tanto, los PIFs ejercen una función antagónica a la luz en la ruta de señalización de fitocromo (de Lucas and Prat, 2014), si bien algunos miembros de la familia, como PIF6, ejercen una regulación positiva sobre esta ruta (Penfield et al., 2010).

Estudios recientes han mostrado que el proceso de de-etiolación está también controlado por las hormonas giberelinas (GAs), brasinosteroides (BRs) y auxinas, y que los factores PIFs actuarían como los principales integradores de estas señales. Las GAs promueven la elongación del hipocotilo al inducir la degradación de las proteínas DELLA, una familia de represores que en *Arabidopsis* incluye cinco miembros: *RGA*, *GAI*, *RGL1-3*, con funciones parcialmente redundantes (Hauvermale et al., 2012; Schwechheimer, 2008). Las DELLAs inhiben el crecimiento de la planta, debido a que unen el dominio de unión al ADN de los PIFs, impidiendo que estos factores se unan a los promotores de los genes diana que regulan (Alabadi and Blazquez, 2009; de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Las GAs son percibidas por el receptor soluble *GID1* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*) (Sun, 2010). El complejo GA-*GID1* interacciona con las DELLAs, y favorece su reconocimiento por el complejo *SCF^{SLY}*, responsable de ubiquitinar estos represores y marcarlos para ser degradados por el sistema proteasoma (Gao et al., 2011; Sun, 2011; Willige et al., 2007). La degradación de estas proteínas libera a los PIFs y permite la activación de los genes con una función en elongación celular.

Los brasinosteroides (BRs) actúan de manera sinérgica con las GA, promoviendo junto con estas hormonas el crecimiento del hipocotilo, así como la elongación del tallo y los peciolo en plantas adultas. De hecho, mutantes alterados en la síntesis o señalización de BRs exhiben un fenotipo enano más acentuado que el de los mutantes de GAs, y se caracterizan por mostrar también un crecimiento de-etiolado en oscuridad (Tanaka, 2003). Por otra parte, la aplicación de GAs no es capaz de inducir la elongación de los mutantes *det2-1*, deficientes en BRs, ni la de los mutantes *bri1-1*, insensibles a BRs, lo que sugiere que los BRs actuarían por debajo de las GAs en el control de la elongación celular (Bai et al., 2012; Gallego-Bartolome et al., 2012). Estas hormonas son percibidas en la membrana plasmática por el receptor *BRI1* (*BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1*), una proteína tipo LRR-RLK que tras la unión de BL heterodimeriza con una segunda LRR-RLK, la proteína *BAK1* (*BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE*), e inicia una cascada de fosforilación que culmina en la activación de los factores *BES1* y *BZR1*, dos factores bHLH atípicos con una función principal en la regulación mediada por BRs (Clouse, 2011; Kim and

Wang, 2010). Recientemente se ha reportado que las proteínas DELLA unen también los factores BES1 y BZR1 (Bai et al., 2012; Gallego-Bartolome et al., 2012; Li et al., 2012c). Estos represores unen la forma activa, no fosforilada, de las proteínas BES1 y BZR1, y bloquean su capacidad de unión al ADN, actuando así de forma similar a como lo hacen con los PIFs. Asimismo, se ha establecido que BZR1 se une al factor PIF4 a través del dominio bHLH y funciona como un co-activador de este factor (Oh et al., 2012). Se ha demostrado que ambas proteínas se unen como un único complejo a los genes que regulan, y que los PIFs son necesarios para la actividad de BZR1, y al revés, que BZR1 es necesario para la elongación celular mediada por PIF4 (Figura 11).

Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son hormonas diterpenoides con un papel esencial en diferentes procesos de desarrollo de la planta, desde la germinación de la semilla, elongación del tallo, expansión de las hojas, formación de tricomas, y la maduración del polen, hasta la inducción de la floración (Achard and Genschik, 2009). Los mutantes deficientes en GA presentan un fenotipo enano, de color verde oscuro y floración tardía, que es totalmente restablecido tras la aplicación de GAs, lo que ha permitido establecer que estas hormonas regulan multitud de procesos de desarrollo en la planta. Las GAs agrupan cerca de 300 compuestos estructuralmente relacionados, entre los que se incluye un gran número de precursores biosintéticos y productos catabólicos, biológicamente inactivos, además de las moléculas activas GA₁, GA₃, GA₇ y GA₄.

La biosíntesis de estas hormonas puede dividirse en tres etapas principales (Olszewski et al., 2002):

- Biosíntesis de *ent*-kaurene en los proplastidos.
- Conversión de *ent*-kaurene a GA₁₂, catalizada por monooxigenasas tipo microsomales.
- Formación de las GAs C20- y C19- en el citoplasma, catalizada por diferentes familias de dioxigenasas (Figura 4).

Tradicionalmente, se han utilizado inhibidores de la síntesis de estas hormonas en agricultura, para retardar el crecimiento de multitud de hortalizas y frutales, o reducir el porte de la planta en monocotiledóneas productoras de grano (Rademacher, 2000). La importancia de estos retardadores del crecimiento se basa en su gran selectividad, dado que exclusivamente inhiben la biosíntesis de GAs. Los inhibidores más específicos son aquellos cuya estructura química se asemeja más a la molécula de GA, y que por tanto bloquean de manera específica el sitio activo de los enzimas sobre los que actúan. El grupo de los triazoles constituyen uno de los inhibidores más activos, entre los que se incluyen el *paclobutrazol* (PAC) y el *uniconazol*. Estos compuestos

inhiben el enzima KO que cataliza la oxidación de *ent*-kaureno a ácido *ent*-kaureónico, además de otras monooxigenasas implicadas en la síntesis de GAs (Figuras 4 y 8).

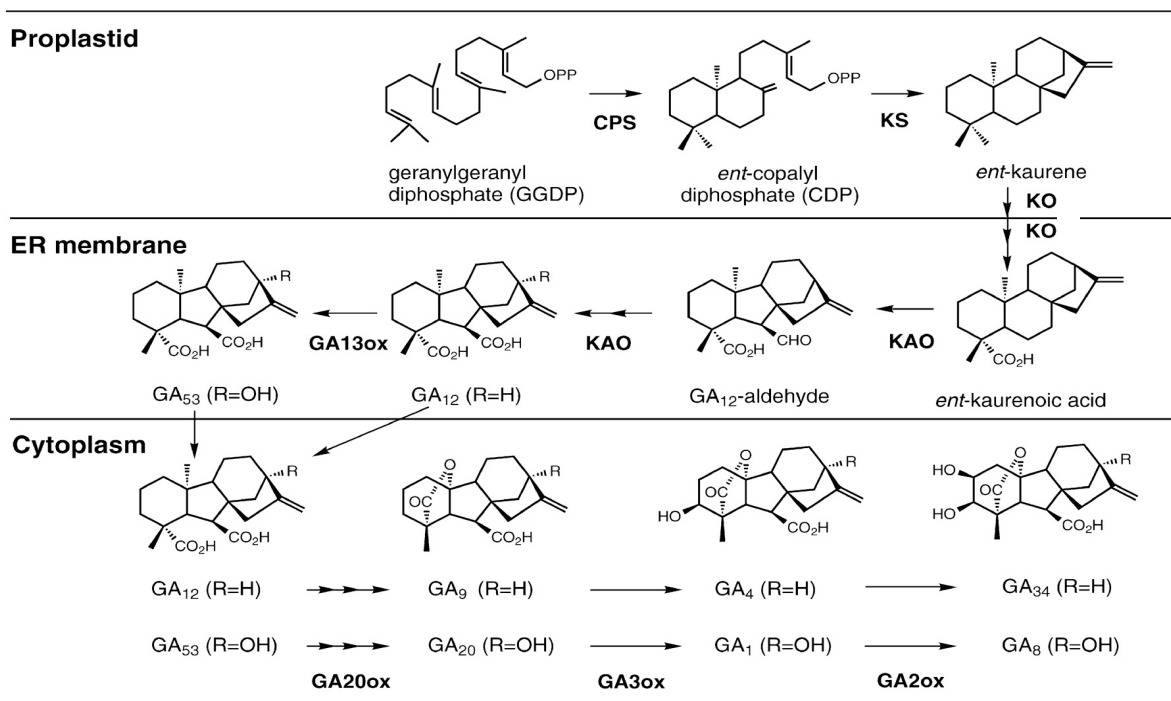


Figura 4. Ruta de biosíntesis de las GAs. La síntesis de hormonas GA se divide en tres etapas principales: biosíntesis de *ent*-kaurene en los proplastidos, conversión de *ent*-kaurene a GA_{12} , a través de monooxigenasas microsomales del citocromo P450 y formación de las GAs C20- y C19- en el citoplasma. (Olszewski et al., 2002).

Las proteínas DELLA, principales represores de la ruta de GA

Las proteínas DELLA pertenecen a la familia GRAS (**G**AI **R**GA **A**nd **S**carecrow) de factores transcripcionales, específicos de plantas. Estas proteínas tienen una función clave en la ruta de señalización de GAs, debido a que actúan como represores nucleares de prácticamente todas las respuestas inducidas por estas hormonas (Chandler et al., 2002; Ikeda et al., 2001; Ogawa et al., 2000; Peng, 1997; Silverstone et al., 1998). Las GAs, por otra parte, contrarrestan su actividad, al señalar la degradación de estos represores por el sistema proteasoma (Achard and Genschik, 2009). Las DELLAs comparten con los otros miembros de la familia GRAS, el dominio C-terminal GRAS conservado, que se caracteriza por presentar dos repeticiones de siete leucinas (LHRI y LHRII) y los dominios VHIID, PFYRE y SAW (Bolle, 2004). Sin embargo, se distinguen de los otros miembros de la familia en su región N-terminal, que incluye los dominios DELLA y TVHYNP, implicados en la degradación dependiente de GAs de estos represores (Hauvermale et al., 2012). Curiosamente, mientras que en arroz, cebada o tomate las DELLAs están codificadas por un gen

único, en *Arabidopsis* se han identificado cinco proteínas DELLA (GA-INSENSITIVE, GAI; REPRESSOR OF GA1-3, RGA; RGA-LIKE1, RGL1; RGL2 Y RGL3), con funciones parcialmente redundantes pero también específicas (Hauvermale et al., 2012; Sun et al., 2012). RGA y GAI, ejercen una función principal en la inhibición del crecimiento vegetativo y retraso de la transición floral (Dill and Sun, 2001; King et al., 2001), RGL2 reprime la germinación (Lee et al., 2002), mientras que RGA, RGL1 y RGL2, conjuntamente regulan el desarrollo de la flor (Cheng et al., 2004; Tyler et al., 2004). RGL3, por otra parte, está implicado en contrarrestar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que contribuye a una mayor tolerancia a distintas condiciones de estrés ambiental (Achard et al., 2008; Wild et al., 2012). Estudios en los que se generaron construcciones quiméricas entre los promotores de los genes *RGA* y *RGL2*, y las regiones codificantes de estas proteínas (*pRGA::RGL2* y *pRGL2::RGA*) mostraron que la diferente función de estas dos DELLAs radica más en su patrón de expresión que en una diferente actividad de la proteína (Gallego-Bartolome et al., 2010). Una pérdida de función de estos genes, en el mutante *global*, recupera totalmente el fenotipo enano del mutante *ga1-3* deficiente en GAs, y da lugar a plantas con un fenotipo alargado, hojas de color verde pálido y floración temprana, indicativo de una respuesta constitutiva a estas hormonas (Fleet and Sun, 2005; Hauvermale et al., 2012; Schwechheimer, 2008).

Percepción de las GAs

Las GAs son percibidas por el receptor soluble GA-INSENSITIVE DWARF1 (GID1) (Ueguchi-Tanaka et al., 2005), codificado en arroz por un único gen. La pérdida de función de este gen único produce un fenotipo enano similar al generado por mutaciones en los genes de biosíntesis de GAs, pero que no puede ser recuperado por la aplicación de GA. En *Arabidopsis*, GID1 está codificado por tres genes (*GID1a*, *-b* y *-c*) de función redundante, lo que ha hecho que no se hayan identificado mutantes insensibles similares a la mutación *gid1* de arroz (Griffiths et al., 2006; Nakajima et al., 2006). La proteína GID1 se localiza principalmente en el núcleo, pero también se encuentra en el citoplasma (Ueguchi-Tanaka et al., 2005; Willige et al., 2007). La unión de GA provoca un cambio de conformación en el receptor GID1, lo que hace que el complejo GA-GID1 se una al dominio conservado DELLA de las proteínas DELLA (Harberd et al., 2009; Sun, 2011). El complejo GID1-GA-DELLA se une a GA₄ con más afinidad que la proteína GID1 sola, lo que indica que la unión de las proteínas DELLA estabiliza la interacción hormona-receptor (Nakajima et al., 2006; Ueguchi-Tanaka et al., 2007). La formación del complejo ternario GID1-GA-DELLA promueve la interacción del dominio C-terminal de las DELLA y la proteína SLY1 (SLEEPY1), o subunidad F-box del complejo E3 ubiquitina ligasa SCF^{SLY1} (Skip, Cullin, F-box). La unión de las DELLAs a este complejo resulta en la ubiquitinación de estos represores y promueve su degradación a través del proteasoma (Dill et al., 2004; Fu et al., 2004; Griffiths et al., 2006;

Harberd et al., 2009; McGinnis et al., 2003) (Figura 5). La región N-terminal de las DELLAs, que incluye el dominio DELLA y TVHYNP, es esencial para la interacción con GID1 (Griffiths et al., 2006; (Willige et al., 2007). Las GAs regulan la expresión génica a través de la degradación de las DELLAs, cuya desestabilización provoca cambios en la expresión génica e induce entre otras respuestas una elongación de la planta (Harberd et al., 2009). Se ha visto también que el complejo GID1-GA es capaz de inhibir la función represora de las DELLA en ausencia de la proteína F-box SLY1, lo que indicaría que la interacción proteína-proteína con estos represores inhibe su actividad (Ariizumi et al., 2008).

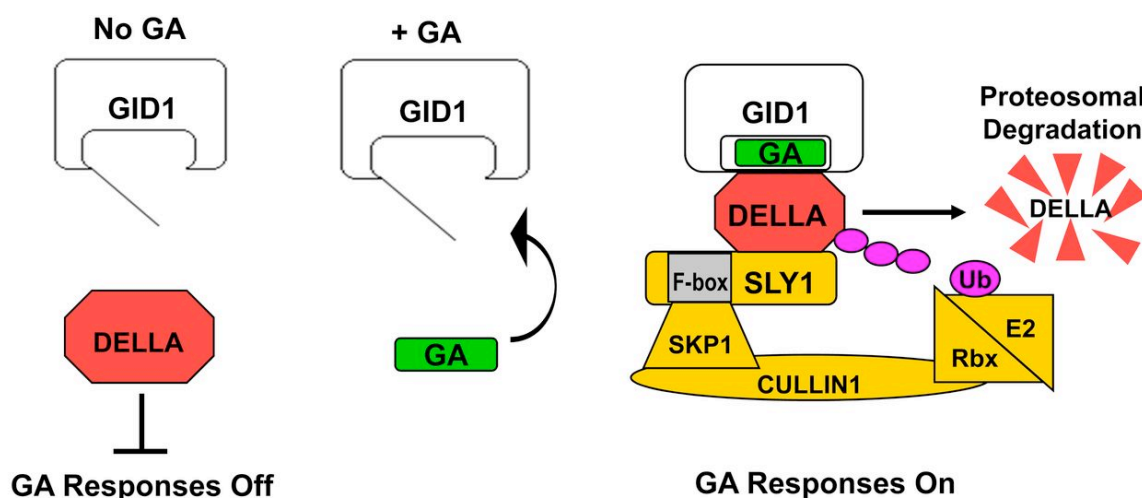


Figura 5. Modelo de señalización mediada por GAs. La percepción de GA provoca un cambio de conformación en la proteína GID1 que promueve la unión del complejo GA-GID1 a las proteínas DELLA. La formación del complejo ternario GID1-GA-DELLA desencadena la interacción proteína-proteína entre el dominio C-terminal de las DELLA y la subunidad F-box de la proteína SLY1 (SLEEPY1) del complejo SCF^{SLY1} E3 ubiquitina ligasa. La unión de las DELLAs a este complejo produce la ubiquitinación de estos represores y promueve su degradación a través del proteasoma. Adaptado de (Hauvermale et al., 2012).

Mecanismos celulares y moleculares regulados por las proteínas DELLA

Las proteínas DELLA controlan crecimiento vegetal y desarrollo. Son capaces de unirse a diferentes clases de proteínas que regulan la elongación del hipocotilo, como por ejemplo los PIFs (PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS) (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008; Gallego-Bartolome et al., 2010) y BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT1) (Bai et al., 2012; Gallego-Bartolome et al., 2012). Controlan la transición floral y el desarrollo del fruto mediante la interacción con los factores SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE) y ALC (ALCATRAZ) respectivamente (Arnaud et al., 2010; Yu et al., 2012). Además, contribuyen a la defensa de la planta mediante la interacción con las proteínas JAZ (JASMONATE ZIM-DOMAIN) (Hou et al., 2010; Wild et al., 2012; Yang et al., 2012). A través de estas interacciones, las proteínas DELLA bloquean la capacidad de unión al ADN de factores de transcripción como los PIFs (de Lucas et

al., 2008; Feng et al., 2008; Griffiths et al., 2006), o inhiben la actividad de reguladores transcripcionales como los JAZs (Hou et al., 2010). Las GAs contrarrestan la función de estos represores, al promover su degradación por el sistema proteasoma. En los últimos años, se han identificado numerosos factores de transcripción que interactúan y son inhibidos por las DELLAs, aunque se ha visto que las DELLAs contribuyen también a la actividad transcripcional de algunos factores, o incluso son inhibidas por otros (An et al., 2012; Cheminant et al., 2011; Feurtado et al., 2011; Hong et al., 2012; Josse et al., 2011; Zhang et al., 2011). De esta forma, las GA son capaces de controlar la expresión de una gran cantidad de genes implicados en la regulación de distintas rutas.

Brasinoesteroides

Las hormonas brasinoesteroides (BRs) tienen también un papel fundamental en la regulación de distintos procesos de desarrollo a lo largo del ciclo vital de las plantas, incluyendo la germinación, la elongación de la raíz y el tallo, la fotomorfogénesis, el desarrollo vascular, la elongación de los distintos órganos florales y la senescencia.

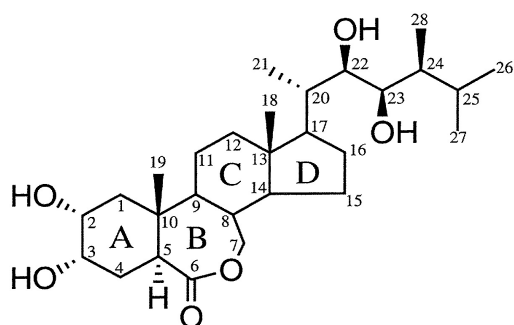


Figura 6. Estructura de la molécula de BL.

El brasinólido (BL) (Figura 6) fue el primer compuesto brasinoesteroide aislado a partir de polen de *Brassica napus*, y es el compuesto más activo (Grove, 1979). El BL tiene una estructura similar a las hormonas esteroides (estrógenos, andrógenos y progesterona) y cortico-adrenales (glucocorticoides y mineralocorticoides) animales, y es el compuesto final de la ruta biosintética. Los BRs están presentes en todas las especies de plantas

estudiadas hasta la fecha. Numerosos bioensayos realizados en diferentes especies y tejidos han demostrado que la aplicación de BL promueve la elongación celular (Mandava, 1988).

Mutantes afectados en la síntesis o señalización de BRs han sido identificados por numerosos laboratorios en todo el mundo (Clouse et al., 1996; Clouse and Sasse, 1998; Fujioka and Yokota, 2003), y se caracterizan por mostrar un fenotipo enano, de hojas redondeadas que se asemejan a una lechuga, tienen reducida fertilidad masculina, floración tardía y senescencia foliar, además de un desarrollo vascular alterado y un crecimiento de-etiolado en oscuridad (Clouse and Sasse, 1998). La caracterización de los genes causantes de estas mutaciones mostró

que bloqueaban varias etapas de la ruta de biosíntesis o de la señal de transducción de estas hormonas.

Metabolismo de los BR

Estudios comparativos entre mutantes deficientes en BRs y plantas silvestres han contribuido a establecer la función catalítica de varios de los enzimas implicados en la ruta de biosíntesis de estas hormonas (Kwon, 2005). Así, se demostró que el campesterol (CR), precursor biosintético específico de BRs, se convierte primero en campestanol (CN) y después en BL, a través de dos rutas paralelas, la ruta temprana y la ruta tardía de oxidación del C-6 (Fujioka and Yokota, 2003) (Figura 7).

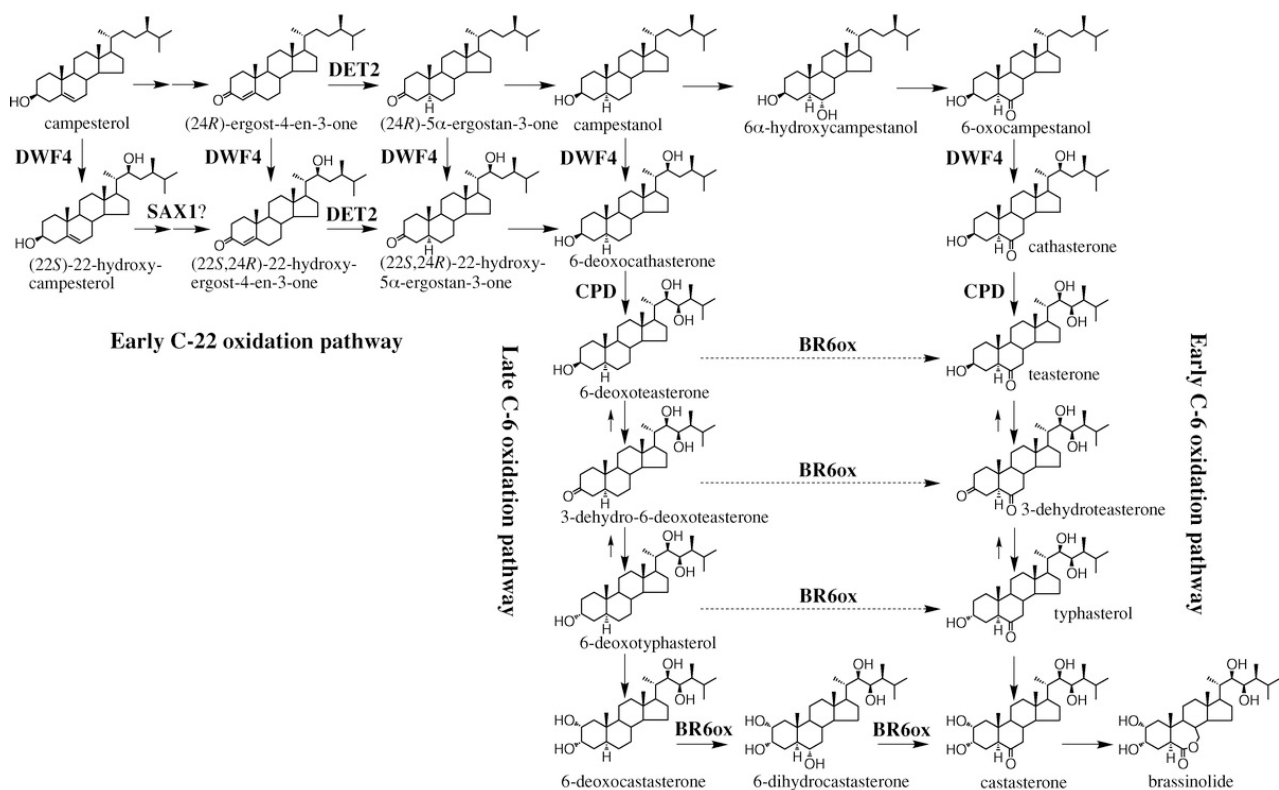


Figura 7. Esquema de la ruta de biosíntesis de los BR. El campesterol (CR), precursor biosintético de los BRs, se convierte en campestanol (CN) a través de la ruta de oxidación temprana C-22, y después en BL a través de dos rutas paralelas, la ruta temprana y tardía de C-6 oxidación. (Fujioka and Yokota, 2003; Yamashino et al., 2013).

En la cuarta y la quinta edición del libro *Plant Physiology* editado por Taiz y Zeiger (Taiz y Zeiger 2006, 2010), los BRs fueron oficialmente incluidos en la lista de fitohormonas junto a las auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico. Los primeros mutantes deficientes en BRs caracterizados experimentalmente fueron *det2* (*de-etiolated 2*), *cpd* (*constitutive photomorphogenesis and dwarfism*) (Li et al., 1996) y *bri1* (*brassinosteroid insensitive 1*) (Clouse

et al., 1996; Li and Chory, 1997). Otro de los mutantes caracterizados fue *dwf4*, una mutación causada por una inserción de T-DNA, que solo puede ser recuperado mediante la aplicación de BRs y no de otras fitohormonas (Azpiroz et al., 1998). *DWF4* codifica el citocromo P450 monooxigenasa (CYP90B1) que comparte un 43% de similitud de secuencia con la proteína CPD (Choe et al., 1998). Esta enzima contribuye a la hidroxilación del C-22 en la ruta de biosíntesis de BR, ya que, solo los BR hidroxilados en el 22 α pueden recuperar el fenotipo del mutante *dwf4* (Choe et al., 1998) (Figura 7).

Una herramienta que ha resultado clave para el estudio de la función de los BRs ha sido la generación de inhibidores específicos de la síntesis de estas hormonas, basados en los compuestos triazoles. En una búsqueda de inhibidores específicos del enzima DWF4, se sintetizaron diferentes derivados de triazol, lo que llevó al descubrimiento del *brassinazole* (BRZ). Este compuesto se une específicamente a la proteína DWF4 y bloquea su actividad, causando un fenotipo enano que puede ser recuperado con la aplicación de BRs (Figura 8) (Asami et al., 2001; Min et al., 1999). El BRZ induce cambios en el transcriptoma antagónicos a los producidos por el tratamiento con BL (Goda et al., 2002) y posee una enorme especificidad teniendo en cuenta que en la planta existen un gran número de enzimas citocromo P450. Así, se ha podido estudiar el papel fundamental de los BRs en las diferentes etapas de desarrollo de la planta, ya que ha hecho posible inhibir la síntesis de estas hormonas de manera dosis dependiente, además de ser activo en prácticamente todas las especies vegetales.

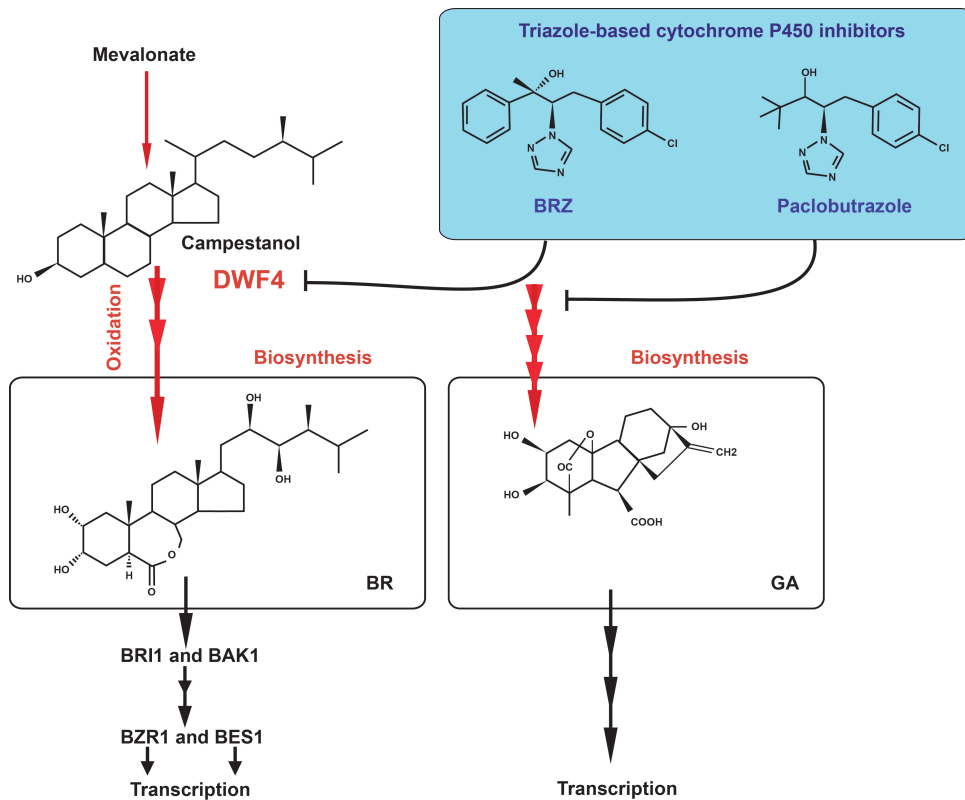


Figura 8. Interferencias específicas de triazoles con hormonas vegetales.

El brassinazol (BRZ) inhibe a DWF4, un citocromo P450 que realiza la oxidación inicial del campestanol, dando lugar a la hormona brasinólido (BR). El paclobutrazol (PAC) inhibe al citocromo P450s en la ruta biosintética que da lugar al ácido giberélico (GA). Adaptado de (Kaschani and van der Hoorn, 2007).

Transducción de la señal de BRs

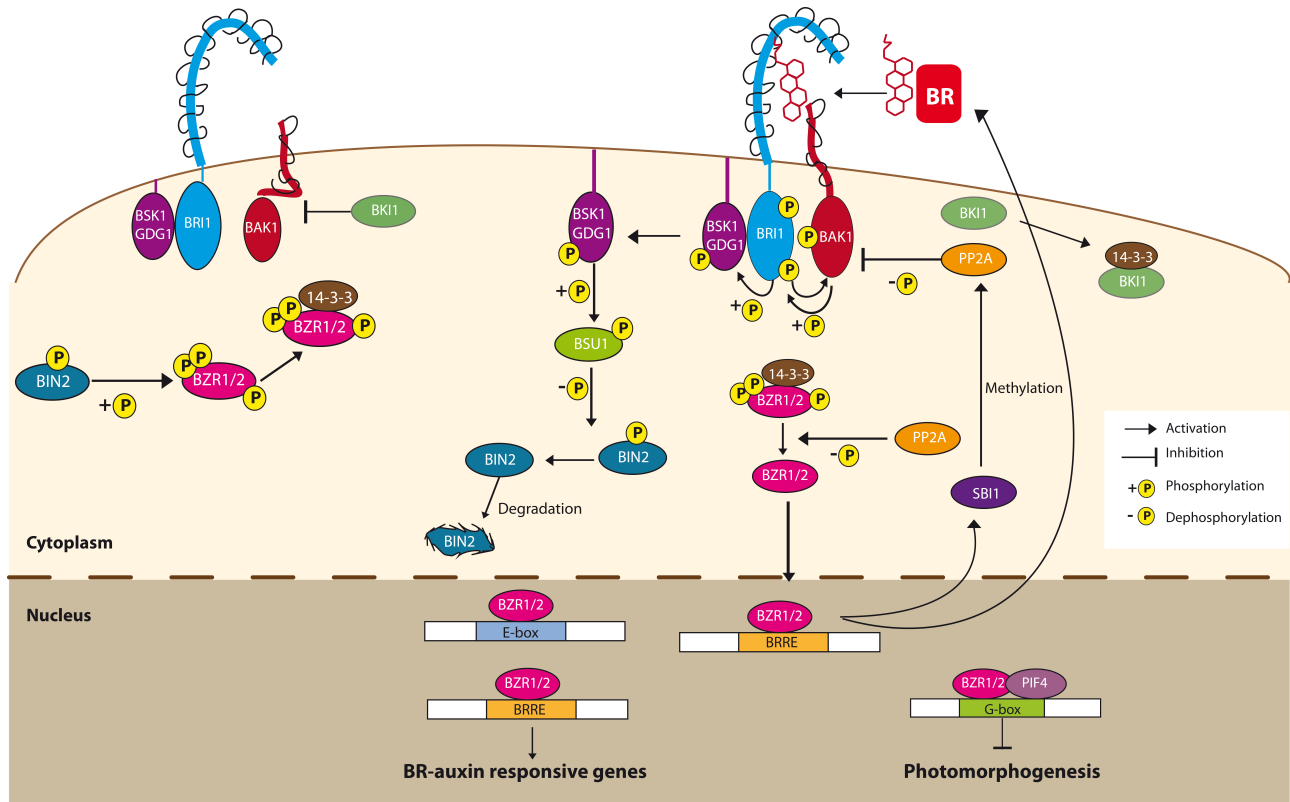


Figura 9. Ruta de señalización de los BR. Los BR regulan diferentes procesos del desarrollo y de la fisiología vegetal. La señal de BR se transduce mediante un receptor quinasa que regula la vía de transducción de la señal, que conlleva en último término a la expresión alterada de diversos genes. Los BRs se unen al receptor quinasa de membrana BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) iniciando una cascada de activación, que implica la incorporación del co-receptor quinasa BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1), la disociación de la quinasa BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR1) que inhibe la asociación de BRI1 con BAK1 y la transfosforilación secuencial entre los dominios quinasa de BRI1 y BAK1. BRI1 fosforila a las quinasas citoplasmáticas que se encuentran ancladas a membrana plasmática, BSK1 (BRASSINOSTEROID-SIGNALLING KINASE1) y GDG1 (CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH1) (Kim et al., 2011; Tang et al., 2008). Esta fosforilación promueve la unión de BSK1 y GDG1 a la fosfatasa BSU1 (BRI1-SUPPRESSOR1) y su consecuente fosforilación (Kim et al., 2011; Kim et al., 2009; Mora-García et al., 2004; Tang et al., 2008). BSU1 inactiva a la GSK3 quinasa BRASSINOSTEROID INSENSITIVE (BIN2) mediante la defosforilación de un residuo conservado de tirosina (Kim and Wang, 2010). De esta manera, los factores de transcripción BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR1) y BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT1) son defosforilados por la PP2A (PROTEIN PHOSPHATASE 2A) (Tang et al., 2011). BZR1 y BES1, una vez defosforilados, pueden migrar al núcleo y unirse a los promotores de sus genes diana, promoviendo su consecuentemente activación o represión (He et al., 2005; Sun et al., 2010; Yu et al., 2011). En ausencia de BR, la proteína BIN2 está activa y fosforila a dos factores de transcripción homólogos BZR1 y BES1 (He et al., 2002; Wang et al., 2002; Yin et al., 2002). La fosforilación de estos factores impide su unión al ADN y provoca su retención en el citoplasma a través de las proteínas 14-3-3 (Bai et al., 2007; Gampala et al., 2007; Heijde and Ulm, 2012; Vert and Chory, 2006). Adaptado de (Zhu et al., 2013).

INTRODUCCIÓN

Los BRs se unen al dominio extracelular del receptor quinasa de membrana BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1 (BRI1), e inician una cascada de señalización que regula en último término la transcripción de numerosos genes (Clouse, 2011; Kim and Wang, 2010; Wang et al., 2012). BRI1 pertenece a la familia LRR-RLKs (Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase) de plantas (Belkhadir and Chory, 2006; Shiu et al., 2004). La unión de los BRs conlleva la activación de la quinasa BRI1 (Hothorn et al., 2011; Kinoshita et al., 2005; Li and Chory, 1997; She et al., 2011; Wang et al., 2001b) al favorecer su unión al co-receptor quinasa BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 (BAK1) (Gou et al., 2012; Li et al., 2002; Nam and Li, 2002), la disociación del inhibidor BRI1 KINASE INHIBITOR1 (BKI1) (Jaillais et al., 2011; Wang et al., 2011; Wang and Chory, 2006) y la trans-fosforilación secuencial entre los dominios quinasa de BRI1 y BAK1 (Clouse, 2011; Wang et al., 2008). La proteína BKI1 fosforilada interacciona con la familia de proteínas 14-3-3 y promueve la activación de la ruta (Wang et al., 2011). Las proteínas BRI1 y BAK1 se localizan principalmente en la membrana plasmática pero además se localizan en membranas de endocitosis, dicha internalización en endosomas es esencial para la señalización (Geldner et al., 2007; Irani et al., 2012; Russinova et al., 2004).

La unión de BRs y trans-fosforilación por BAK1 activa el dominio quinasa de BRI1, que fosforila a los miembros de dos grupos de quinasas citoplasmáticas, ancladas a la membrana plasmática, BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 1 (BSK1) y CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH1 (GDG1) (Kim et al., 2011; Tang et al., 2008). Esta fosforilación promueve la unión de BSK1 y GDG1 a la fosfatasa BRI1-SUPPRESSOR1 (BSU1) y su consecuente fosforilación (Kim et al., 2011; Kim et al., 2009; Mora-Garcia et al., 2004; Tang et al., 2008). BSU1 inactiva entonces a la GSK3 quinasa BRASSINOSTEROID INSENSITIVE (BIN2) mediante la de-fosforilación de un residuo tirosina conservado (Kim and Wang, 2010).

En ausencia de BRs, o cuando los niveles de BRs son bajos, la proteína BIN2 esta activa y fosforila a dos factores de transcripción homólogos, BRASSINAZOLE RESISTANT1 (BZR1) y BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (BES1) (también conocido como BZR2) (He et al., 2002; Wang et al., 2002; Yin et al., 2002). La fosforilación de estos factores impide su unión al ADN y provoca su retención en el citoplasma a través de las proteínas 14-3-3 (Bai et al., 2007; Gampala et al., 2007; Vert and Chory, 2006). Cuando los niveles de BRs son altos, BIN2 es inactivado por la fosfatasa BSU1 y degradado a través del proteasoma (Peng et al., 2008), al mismo tiempo que BZR1 y BES1 son defosforilados por la PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A) (Tang et al., 2011). BZR1 y BES1, una vez defosforilados, pueden migrar al núcleo y unirse a los promotores de sus genes diana, promoviendo su consecuente activación o represión (He et al., 2005; Sun et al., 2010; Yu et al., 2011). Estudios recientes indican que la fosfatasa PP2A podría ejercer una doble función en la regulación de la señalización de BRs: por un lado regularía positivamente la señalización a través

de la desfosforilación de los factores BZR1 y BES1 y por otro, participaría en la retro-regulación negativa de la ruta, mediante la de-fosforilación del receptor BRI1 (Gruszka, 2013).

Los factores de transcripción BZR1 y BES1 comparten un 88% de identidad de secuencia y un 97% de similitud en sus dominios de unión al ADN (Wang et al., 2002). Estudios iniciales demostraron que BZR1 se uniría al motivo BR-RESPONSE ELEMENT (BRRE, CGTGC/TG), para reprimir la expresión génica (He et al., 2005), mientras que BES1 interacciona con el factor bHLH BES1 INTERACTING MYC-LIKE1 (BIM1) y se uniría junto a este factor al motivo E-box (CANNTG), para activar la expresión génica (Yin et al., 2005). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que tanto BZR1 como BES1 se unen a motivos similares y comparten actividades semejantes, actuando como activadores o represores transcripcionales según el tipo de genes diana (Sun et al., 2010; Yu et al., 2011).

Las GSK3 quinasas

Las GSK3 quinasas pertenecen a un grupo de Ser/Thr quinasas, altamente conservadas en animales y plantas, donde ejercen un papel regulador principal en muchas rutas de señalización (Doble and Woodgett, 2003; Frame and Cohen, 2001). Se ha visto que estas quinasas fosforilan a una gran variedad de proteínas, y son inactivadas en respuesta a diferentes señales biológicas, tras ser fosforiladas en un residuo Tyr conservado (Frame and Cohen, 2001; Woodgett, 2001). La mayoría de sustratos de las GSK3 quinasas contienen motivos consenso repetidos de fosforilación, (S/T)-X-X-X-(S/T) (donde S/T corresponde a serina/treonina, y X a cualquier aminoácido). La fosforilación de estos motivos consenso requiere a menudo una eficiente interacción quinasa-sustrato (Woodgett, 2001). En animales, se ha visto que esta interacción depende de una fosforilación previa del sustrato, por a otra quinasa diferente, en residuos Ser localizados en la zona C-terminal del motivo consenso (S/T)-X-X-X-(S/T), lo que permite una interacción específica con la quinasa GSK3 (Dajani et al., 2001; Frame et al., 2001; ter Haar et al., 2001). En otros casos el reconocimiento de la proteína sustrato es asistida por una proteína auxiliar, que une simultáneamente la GSK3 y el sustrato, lo que incrementa considerablemente la concentración local de la proteína sustrato, promoviendo así su fosforilación (Wu and Pan, 2010).

Aunque BIN2 cuenta con un residuo Tyr idéntico al observado en las GSK3 quinasas animales, cuya fosforilación es esencial para su actividad quinasa (Li and Nam, 2002), se ha visto que para su fosforilación *in vitro* de BES1 y BZR1, no se requiere la fosforilación previa de estos sustratos, ni de la colaboración de una proteína auxiliar (Zhao et al., 2002). Así, a diferencia de las GSK3 quinasas de mamíferos, las GSK3 de plantas son capaces de fosforilar sus proteínas dianas gracias a una interacción directa con el sustrato a través de un dominio “*docking*” (Peng et al., 2010).

Mecanismos celulares y moleculares regulados por BR

Los BRs regulan a nivel celular, tanto la elongación, como la división y diferenciación celular. A nivel global, estas hormonas controlan procesos tan diversos como la elongación del hipocotilo, el desarrollo de la raíz, la fertilidad del polen, la senescencia de la planta, y la respuesta a distintos tipos de estrés biótico y abiótico (Figura 10) (Yang et al., 2011).

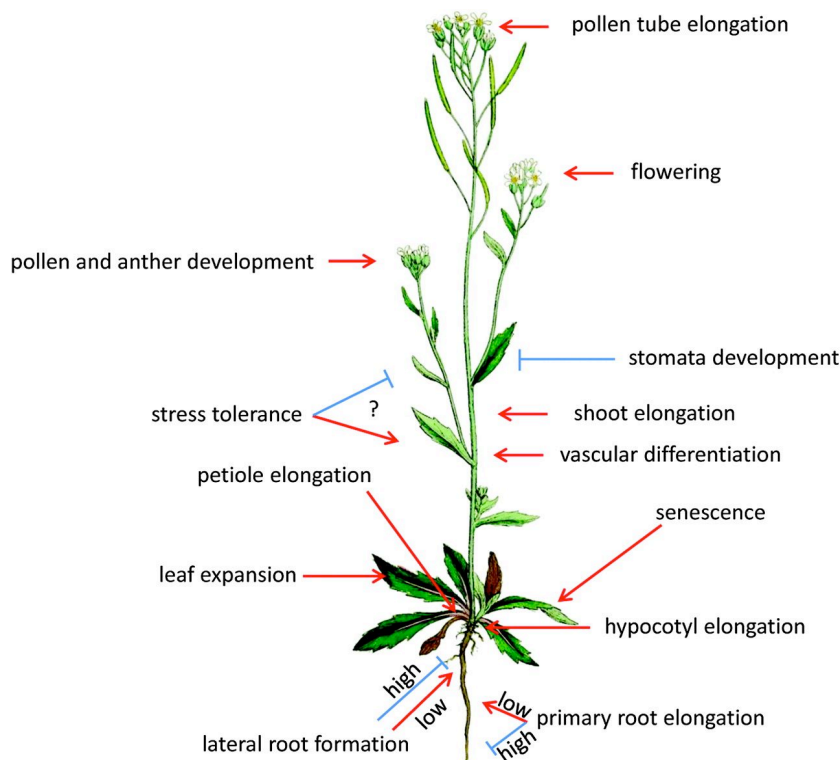


Figura 10. Funciones que desempeñan los BRs en la regulación del desarrollo vegetal.

Las flechas rojas indican los procesos de desarrollo que promueven los BR y las flechas azules los procesos de desarrollo inhibidos por los BRs. (Yang et al., 2011)

En 1990, diferentes estudios genéticos mostraron que los mutantes deficientes o insensibles a estas hormonas presentaban un fenotipo de-etiolado en oscuridad y eran extremadamente enanos en luz (Salchert et al., 1998). La aplicación de BR a los mutantes *cpd* y *dwf4*, deficientes en la síntesis de estas hormonas, hace que recuperen su fenotipo enano y muestren un crecimiento etiolado en oscuridad, lo que indica que estas hormonas ejercen un papel antagónico en la señalización de la luz (Azpiroz et al., 1998; Szekeres et al., 1996). Estudios moleculares han demostrado que su función en elongación celular depende de la activación transcripcional de los enzimas XETs (*xyloglucan endotransglycosylases*), cuya función es incorporar moléculas de xyloglucano a la pared celular. Estos enzimas son esenciales para relajar la pared o reforzarla, tras la elongación de la célula, y efectivamente los genes *XET*, *TCH4* en *Arabidopsis* y *BRU1* en

soja, se inducen rápidamente por BRs en las primeras etapas de elongación (Xu et al., 1995; Zurek and Clouse, 1994).

Relación entre las rutas señalización de BR y GA

Los BR y las GAs ejercen efectos similares en diferentes procesos de desarrollo a lo largo del ciclo vital de la planta (Depuydt and Hardtke, 2011). Aunque hasta hace poco, se había considerado que los efectos de estas hormonas eran aditivos (Depuydt and Hardtke, 2011), y que sus rutas de señalización actuaban de manera independiente (Li et al., 2012c; Nemhauser et al., 2006), estudios recientes han demostrado que las rutas de señalización de BRs y GA están directamente relacionadas (Bai et al., 2012; Gallego-Bartolome et al., 2012; Li et al., 2012c). La aplicación de GA no promueve la elongación del hipocotilo en mutantes deficientes o insensibles a BRs, mientras que la aplicación de BRs sí que es capaz de promover la elongación en mutantes deficientes en GA. Además, las proteínas DELLA interaccionan con BZR1 e inhiben su unión al ADN, por lo que las GAs contribuyen a activar la transcripción de genes regulados por BRs, al liberar a BZR1 de la inhibición ejercida por las DELLA (Bai et al., 2012; Gallego-Bartolome et al., 2012; Li et al., 2012c). Por otra parte, se ha establecido que BZR1 se une a PIF4 y actúa como un co-activador de este factor (Oh et al., 2012). De hecho se ha visto que estos factores se unen como un único complejo a motivos G-box y E-box en los promotores de multitud de genes implicados en expansión celular y en la síntesis y señalización de auxinas (Oh et al., 2012). Estos resultados indicarían que la interacción directa entre BZR1, los PIFs y las proteínas DELLA juega un papel central en la integración de las señales de luz, BRs y GA, y conjuntamente regula el transcriptoma responsable de activar el programa fotomorfogénico de desarrollo en la luz (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008) (Figura 11).

INTRODUCCIÓN

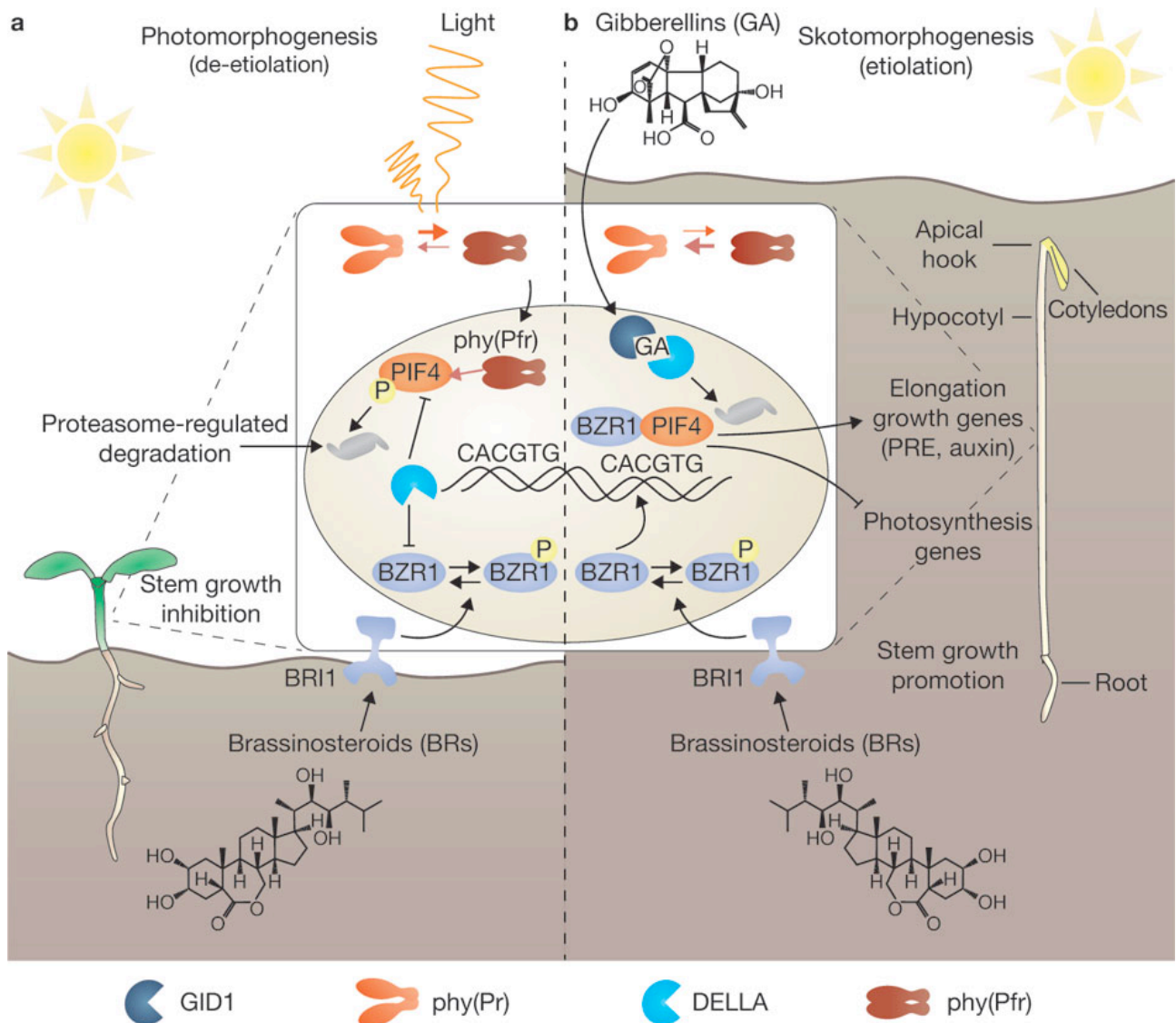


Figura 11. Regulación de la morfogénesis mediada por luz, BRs y GAs. Esquema de las interacciones entre los reguladores transcripcionales PIF, DELLA y BZR durante los procesos de fotomorfogénesis (a) y escotomorfogénesis (b). Las GAs se acumulan preferentemente en la luz mientras que los BRs se acumulan tanto en luz como en oscuridad. Los fitocromos regulan negativamente a los PIFs, los ubiquitina e inducen su degradación por el sistema proteasoma, impidiendo así que se unan a los promotores de los genes diana con función en elongación celular. A su vez, los GAs regulan positivamente a los factores BES1/BZR1 y a PIF4. Las GA degradan a las proteínas DELLA. Estos represores bloquean a PIF4, BES1/BZR1, y su degradación promueve la elongación del hipocotilo. (Jaillais and Vert, 2012).

OBJETIVOS

La luz, junto con el reloj circadiano, la temperatura y las hormonas GA y BR modulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, a través de la regulación de los factores PIFs, que ejercen un papel central en el control de la elongación celular. Estos factores se unen a elementos G-box y E-box en los promotores de los genes implicados en la remodelación de la pared celular, para activar su expresión. El aumento en los niveles de expresión de estos genes conlleva a la expansión de la pared celular, paso esencial para la elongación celular y crecimiento del hipocotilo. La luz es el factor principal que regula a los PIFs, al inducir su degradación tras interaccionar con la forma activa de PHYB. Sin embargo, se ha visto que estos factores no están regulados únicamente por luz, sino que el reloj circadiano controla también su patrón diurno de expresión. Por otra parte, las DELLA secuestran estos factores formando un complejo que no es capaz de unirse al ADN. Las GAs promueven su actividad, al inducir la degradación de las proteínas DELLA, lo que permite la acumulación de estos factores en su forma libre en el núcleo, y la unión a los promotores de sus genes diana.

Los BRs actúan de forma sinérgica a las GAs, promoviendo al igual que estas hormonas la etiolación de los brotes y la elongación del hipocotilo. Resultados previos obtenidos en el laboratorio indicaban que es preciso que la ruta de BRs esté activada para que las GAs puedan promover la elongación celular. Existían indicios de que ambas rutas interaccionan por debajo de los represores DELLA, ya que en mutantes *det2-1*, deficientes en la síntesis de BRs, las DELLAs se degradan tras la aplicación de GAs, pero esto no conlleva una elongación del hipocotilo. En base a estas evidencias, el principal objetivo de este trabajo consistió en determinar un modelo de acción que explicara la regulación cruzada entre ambas rutas de señalización. Para ello, se abordaron los siguientes objetivos:

1. Determinar la relación entre las rutas de señalización GA y BRs.
2. Demostrar la interacción entre PIF4 y la quinasa BIN2 mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, y llevar a cabo ensayos de fosforilación *in vitro* para probar que PIF4 es un sustrato de BIN2
3. Generar mutaciones en el dominio consenso de fosforilación de BIN2 y analizar su efecto sobre la estabilidad de la proteína mutante PIF41A.
4. Analizar el patrón diurno de crecimiento del hipocotilo de las plantas PIF4 así como de las líneas generadas con la mutación (PIF41A).

OBJETIVOS

5. Determinar si las mutaciones generadas en la proteína PIF4 son capaces de recuperar el fenotipo enano del mutante *bin2-1*.

En este punto del trabajo se pudo establecer que PIF41A a pesar de ser más estable en presencia del inhibidor BRZ, no era capaz de complementar la mutación *bin2-1*. Por otra parte se publicó un trabajo en el que se demostraba que BZR1 funcionaba como un co-activador de PIF4, y que la acumulación nuclear de ambas proteínas es necesaria para la elongación celular. Por consiguiente nos planteamos como objetivos adicionales:

6. Generar líneas *bes1-D pPIF4::PIF41A*, y analizar la expresión de sus genes diana y el crecimiento del hipocotilo en estas plantas.
7. Establecer un mecanismo de acción de los reguladores PIF4 y BES1/BZR1 que contribuya a entender el modelo de regulación cruzada entre las rutas GA y BR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Métodos de clonaje

La mayoría de las construcciones utilizadas se generaron mediante el sistema de Gateway (pENTR™ Directional TOPO® Cloning kit y Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix, Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificaron los genes deseados con cebadores específicos, los productos de PCR se separaron en gel de electroforesis y se purificaron después con el kit de extracción a partir de gel (QIAGEN QIAquick® Gel extraction kit). Los plásmidos generados con las correspondientes construcciones se transformaron en bacteria y se analizaron mediante minipreps. Los clones positivos se amplificaron y se purificó el ADN plasmídico con el kit de Midi-Prep (QIAGEN QIAprep® Midi-Prep kit).

El resto de construcciones se generaron mediante clonaje posicional, los genes de interés fueron amplificados con cebadores específicos que contenían sitios de restricción y se clonaron en el vector pGEM®T-Easy (Promega) según las instrucciones del fabricante. Los plásmidos generados se digirieron con las enzimas de restricción elegidas, se separaron en gel de electroforesis y se purificaron los fragmentos que luego serían ligados en los plásmidos previamente digeridos con las enzimas de restricción compatibles. La ligación se incubó con la enzima T4 *ligase* (Fermentas). Para el clonaje y amplificación de los plásmidos se utilizó la cepa de *E. Coli DH5α* (Woodcock et al., 1989). Las células se transformaron mediante choque térmico (Sambrook *et al.* 1989) y se plaquearon en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con el correspondiente antibiótico.

Se generaron construcciones con la secuencia consenso de fosforilación mutada. En la construcción PIF41A se sustituyeron las Ser/Thr por Ala en el motivo conservado $\underline{T}^{160}\underline{V}\underline{G}\underline{P}\underline{S}^{164}\underline{H}\underline{C}\underline{G}\underline{S}^{168}$, con el fin de generar una forma no fosforilada de la proteína. Además se generó una construcción que contenía una segunda mutación en la que se sustituyó la Ser²⁰² por Ala. Se amplificó mediante PCR las regiones N- y C-terminal de la proteína que incluían las mutaciones deseadas (*PIF41Af* con *PIF4YFPf* y *PIF41Ar* con *PIF4YFPf*; *PIF42Af* con *PIF4YFPf* y *PIF42Ar* con *PIF4YFPf*) y se purificaron los fragmentos correspondientes. Dichos fragmentos se mezclaron en cantidades equimoleculares, se desnaturalizaron durante 5' a 95°C y se dejaron renaturalizar durante 30 min a 50°C, siendo posteriormente utilizados como DNA molde en una reacción de amplificación con los cebadores *PIF4YFPf* y *PIF4YFPf*, específicos sobre las regiones ATG y stop del gen.

Construcciones realizadas para vectores de expresión en planta y en levadura

Para generar los vectores de expresión en planta se utilizó el sistema Gateway y se usó el vector pENTR™/SD-TOPO® (Invitrogen) como plásmido de entrada. Se usaron los vectores pGWB5 y pGWB14 (Nakagawa et al., 2007a) para generar las fusiones GFP y HA. Para las construcciones con luciferasa se utilizó el vector destino pLuc-Trap3 (Calderon-Villalobos et al., 2006).

Para los ensayos de doble híbrido se utilizaron los vectores pGADT7 y pGBKT7 (Clontech). En el laboratorio se generaron versiones modificadas *Gateway* de estos vectores mediante la inserción del cassette *ccdB* Gateway con los sitios de restricción *NdeI-XhoI* en el sitio de clonaje múltiple (MSC) que contiene los sitios *NdeI-SalI*. De esta forma pudimos clonar fácilmente en estos vectores las secuencias insertadas en el vector pENTR™-TOPO® mediante LR Clonase™.

Tabla 1. Construcciones en pENTR™.

Construcción	Plásmido	Selección	Observaciones	Método de clonaje
<i>BES</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+	Cedido por de Lucas M	TOPO
<i>BIN2</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+	Cedido por de Lucas M	TOPO
<i>pPIF4</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+		TOPO
<i>PIF4</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+	Cedido por de Lucas M	TOPO
<i>PIF41A</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+		TOPO
<i>PIF4del1</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+	Cedido por de Lucas M	TOPO
<i>PIF4del2</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+	Cedido por de Lucas M	TOPO
<i>PIF4del3</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+	Cedido por de Lucas M	TOPO
<i>PIF4del4</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+	Cedido por de Lucas M	TOPO
<i>PIF4del5</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+	Cedido por de Lucas M	TOPO
<i>pPIL1</i>	pENTR™/SD-TOPO®	Kan+		TOPO

Tabla 2. Construcciones binarias.

Construcción	Plásmido	Selección	Observaciones	Método de clonaje
<i>pPIL1::LUC</i>	pLucTrap3 (Calderon-Villalobos et al., 2006)	Kan+		Gateway
<i>35S::PIF4-HA</i>	pGWB14 (Nakagawa et al., 2007b)	Kan+		Gateway
<i>35S::PIF4-GFP</i>	pGWB5 (Nakagawa et al., 2007b)	Kan+		Gateway
<i>35S::PIF41A-GFP</i>	pGWB5 (Nakagawa et al., 2007b)	Kan+		Gateway
<i>pPIF4::PIF4-HA</i>	pPZP122/WB14	Sp/Sm+		Gateway
<i>pPIF4::PIF41A-HA</i>	pPZP122/WB14	Sp/Sm+		Gateway
<i>nYFC-PIF4</i>	pYFN43 (Belda-Palazon et al., 2012)	Kan+		Gateway
<i>cYFC-BIN2</i>	pYFC43 (Belda-Palazon et al., 2012)	Kan+		Gateway
<i>pBINAR</i>	pBIN19	Kan+	(Hofgen, 1990)	
<i>p19</i>	pBIN61	Kan+	(Voinnet et al., 1999)	

Tabla 3. Construcciones para purificación de proteínas.

Construcción	Plásmido	Selección	Observaciones	Método de clonaje
<i>GST-BIN2</i>	pGEX2T	Amp+		Gateway
<i>MBP-BES1</i>	pMALc2	Amp+		Gateway
<i>PIF4-His</i>	pET23a(+)	Amp+	(<i>EcoRI/NdeI</i>)	Clonaje posicional
<i>PIF41A-His</i>	pET23a(+)	Amp+	(<i>EcoRI/NdeI</i>)	Clonaje posicional

Tabla 4. Construcciones para doble híbrido.

Construcción	Selección	Observaciones	Método de clonaje
pGBKT7 (Dominio de unión GAL4, cebo)			
<i>BIN2</i>	Kan+		Gateway
pGADT7 (Dominio de activación GAL4, presa)			
<i>BES1</i>	Amp+		Gateway
<i>PIF4</i>	Amp+	(<i>EcoRI</i>) 5 Glicinas antes del ATG Descrito en (de Lucas et al., 2008)	Clonaje posicional
<i>PIF41A</i>	Amp+		Gateway
<i>PIF4del1</i>	Amp+	Descrito en (de Lucas et al., 2008)	Gateway
<i>PIF4del2</i>	Amp+	Descrito en (de Lucas et al., 2008)	Gateway
<i>PIF4del3</i>	Amp+	Descrito en (de Lucas et al., 2008)	Gateway
<i>PIF4del4</i>	Amp+	Descrito en (de Lucas et al., 2008)	Gateway
<i>PIF4del5</i>	Amp+		Gateway

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Para el crecimiento de las plantas *in vitro*, las semillas se esterilizaron con etanol 70% (v/v) y Triton X-100 0,01% (v/v) durante 15 minutos, después se realizaron dos lavados con etanol 96% (v/v) de dos minutos cada uno y se dejaron secar en campana estéril. Las semillas se plaquearon en medio de germinación Murashige y Skoog (Duchefa Biochemie BV, Netherlands) con 1% de sacarosa y 0,8% de bacto agar (Difco). Una vez sembradas las semillas se estratificaron durante 2-3 días a 4°C en oscuridad y después se pasaron a cámaras de cultivo en condiciones de día largo (16h luz/ 8h oscuridad). Para las plantas crecidas en oscuridad las placas se taparon con varias capas de papel de aluminio después de inducir la germinación.

Para los tratamientos con giberelinas GA₃ (Sigma-Aldrich) y *Paclobutrazol* (Duchefa) se usaron concentraciones 0,5 μM y 25 μM respectivamente. El tratamiento con brassinosteroides (24-epibrassinolide, Duchefa Biochemie BV, Netherlands) se realizó a una concentración 1,0 μM y con brasinazol (Brz2001, cedido por Tadao Asami, Universidad de Tokyo, Japón) a una concentración 0,5 μM. El Cloruro de Litio se usó a una concentración final 20 mM y la *bikinina* (Calbiochem) a 30 μM.

En todos los experimentos el material vegetal se recogió cuidadosamente con pinzas para su observación en el microscopio o para conservarlo en N₂ líquido para el posterior análisis de

proteína o extracción de ARN. Para recoger el material en oscuridad se usó una lámpara de luz verde. Para los tratamientos con MG132 (Calbiochem), cycloheximida (SIGMA), GA₃ (Duchefa), BL (Duchefa), BRZ y *bikinina* (Calbiochem) las plantas fueron transferidas a medio MS líquido con los correspondientes compuestos e incubados en paralelo con medio MS como control. Las plántulas se secaron en un papel para eliminar el exceso de líquido y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

Para los tratamientos con cicloheximida (SIGMA), las plantas se crecieron en medio sólido durante 7 días y después se pasaron a medio MS líquido con 2 μ M BRZ. Después de 12 horas en tratamiento con BRZ, las plantas se transfirieron de nuevo a medio MS líquido con 2 μ M BRZ y a medio líquido MS con BRZ y 1 μ M BL durante 2 horas. Finalmente, las plantas se transfirieron a medio MS líquido que contenía los distintos compuestos más 50 μ M cicloheximida (CHX), en paralelo se incubaron muestras en medio líquido MS con BRZ como control. Las muestras se recogieron a distintos tiempos antes de que se encendiera la luz.

Tratamiento con la fosfatasa CIP (calf intestinal phosphatase)

Para el tratamiento con CIP, las semillas PIF4-HA se crecieron durante 7 días en medio MS suplementado con solución control (mock), BRZ (0,5 μ M BRZ) y BL (1 μ M BL). El tratamiento con la fosfatasa CIP se llevó a cabo según se describe en (Ni et al., 2013) con alguna modificación. Las proteínas se extrajeron con 50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 40 mM 2-mercaptoetanol, 1%SDS, 1 mM PMSF e inhibidores de proteasas, las muestras se hirvieron durante 3 minutos y se centrifugaron. Las proteínas extraídas se diluyeron 5 veces en el tampón calf intestinal alkaline phosphatase (50 mM Tris pH 8.8, 1% Triton X-100, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) y se incubaron a 37°C durante una hora con o sin CIP (New England Biolabs, 400 unidades/mL). La reacción se paró hirviendo las muestras con tampón de carga 2xSDS.

Longitud de los hipocotilos

Para medir la longitud de los hipocotilos, se crecieron las plántulas en placas verticales con medio de germinación MS que contenía 11g/L de bacto agar (difco) para aumentar la fortaleza del medio. Las placas fueron fotografiadas y los hipocotilos se midieron, desde el meristemo apical hasta el punto donde empieza la raíz, con ayuda del programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para cada experimento se tomó la media y la desviación estándar de al menos 10 plantas.

Líneas transgénicas generadas y mutantes

Todos los mutantes de *Arabidopsis* y las líneas transgénicas utilizados son ecotipo *Columbia* (*Col-0*), excepto los mutantes *sly1.10* (Dill et al., 2004), *gai1.1* (Koornneef 1985) y *ga1.3* (Michaels and Amasino, 1999) que son ecotipo *Lansberg erecta* (*Ler*).

Las plantas *PIF41A**bin2-1* se obtuvieron mediante el cruce de la línea de sobre-expresión PIF41A en el mutante *bin2-1*. Las líneas sobre-expresoras *bin2-1* heterocigotas (+/-) y homocigotas (-/-) se identificaron en la F3 mediante PCR con los cebadores *bin2-1f/r*, y la digestión con *XhoI* (corta en el silvestre pero no en el mutante que contiene el alelo *bin2-1*).

Para generar las plantas *pif4pif5pPIF4::PIF4* y *pif4pif5pPIF4::PIF41A*, las plantas pPIF4::PIF4-HA y pPIF4::PIF41A-HA se transformaron en el mutante *pif4pif5*.

Para obtener las plantas *bes1-DPIF41A*, las plantas *pif4pif5pPIF4::PIF41A* se transformaron con la construcción pBES1::*bes1-D*.

Tabla 5. Líneas transgénicas estables de *Arabidopsis* utilizadas en este estudio.

Nombre de la línea	Referencia	Observaciones	TAG
<i>pif4101</i>	(de Lucas et al., 2008; Huq and Quail, 2002)		
<i>pif4-101pif5-1</i>	(de Lucas et al., 2008)	<i>pif4pif5</i>	
35S::PIF4-HA	(de Lucas et al., 2008)		HA
35S::PIF4-GFP	Este trabajo		GFP
35S::PIF41A-GFP	Este trabajo		GFP
<i>pPIF4::PIF4</i> -HA	Este trabajo	Resistencia a Gm+	HA
<i>pPIF4::PIF41A</i> -HA	Este trabajo	Resistencia a Gm+	HA
<i>PIF4OX</i>	(Huq and Quail 2002)		
<i>phyB-9</i>	(Reed et al., 1993)		
<i>sly1.10</i>	(Dill et al., 2004)	Cedidos por Peter Hedden, Rothamsted Research Institute	
<i>gai1.1</i>	(Koornneef 1985)		
<i>ga1.3</i>	(Michaels and Amasino, 1999)		
<i>det2.1</i>	(Chory et al., 1991; Koornneef, 1985)		
<i>global</i>	(Feng et al., 2008)	Mutante quintuple <i>della rga-t2/gai-t6/rgl1-1/rgl2-1/rgl3-1</i>	
<i>bes1-D</i>	(Yin et al., 2002)		

<i>bin2-1</i>	(Li et al., 2001)		
<i>pPIL1::LUC</i>	(Li et al., 2012a)	Resistencia a Kan+ Cedida por Joanne Chory, Salk Institute	
<i>pRGA::GFP-RGA</i>		Cedida por Tai-ping Sun, Duke University	GFP
<i>det2-1</i> <i>pRGA::GFP-RGA</i>		Cruce	GFP
<i>bes1d</i> <i>pPIF4::PIF41A-HA</i>		Cruce	HA
<i>PIF41A bin2-1</i>		Cruce	

Expresión y purificación de proteínas

Para la expresión de las proteínas PIF4 y PIF1A en *E. coli* las regiones codificantes fueron amplificadas a partir de los vectores pENTR™/D-TOPO con los primers *PIF4glyf/r* que añaden los sitios de restricción *NdeI/EcoRI* y un linker de 5 glicinas (*PIF4glyr*). Los fragmentos obtenidos en la PCR se digirieron con *NdeI/EcoRI* y se clonaron en esos mismos sitios en el vector pET-23a (+) (Novagen) para generar fusiones de His-tag en el extremo C-terminal de estas proteínas. Para la fusión BES1-MBP, la región codificante de BES1 en el vector pENTR™/D-TOPO fue clonada en el vector pMAL-c2 (NEB) mediante tecnología Gateway. BIN2 se fusionó a GST con el vector pGEX2T (GE Healthcare) mediante amplificación por PCR con los primers *BIN2f/BIN2GSTR*. Para su expresión en *E. coli* las construcciones GST-BIN2 y MBP-BES1 se transformaron en la cepa de *E. coli* BL21 y la construcción PIF4-His en la cepa Rosseta de *E. coli*. Las proteínas se purificaron usando agarosa glutation (Clontech), glutatión agarosa, amilosa glutatión (NEB) y resina de Ni-NTA agarosa (Qiagen) siguiendo los protocolos estándar del fabricante.

Ensayos in vitro quinasa y de fosforilación

Para realizar los ensayos quinasa, se incubaron las proteínas PIF4-His y MBP-BES con GST-BIN2 en el tampón quinasa (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1mM DTT y 1 μM ATP) y con 5 μCi ³²P-γATP, durante 40 min a 37°C. Para inhibir específicamente la reacción de fosforilación se añadieron 2 y 20 μM de *bikinin* (Calbiochem), un inhibidor específico de la quinasa BIN2 (De Rybel et al., 2009). La reacción se paró añadiendo el mismo volumen de tampón de carga 2x SDS y calentando 5 min a 94°C. Las proteínas fosforiladas se separaron en un gel SDS-PAGE al 8%, el gel se tiñó con azul de *coomassie* y se secó en un secageles durante 2 horas a 65°C. La radioactividad incorporada por las proteínas se analizó mediante el sistema de detección *FX molecular imager system* (Biorad) y el programa *Image Quant* (Biorad).

TNT y ensayos in vitro GST-pull-down

Se usó el sistema TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate (Promega) para sintetizar las proteínas PIF4 y BES marcadas radioactivamente con ^{35}S -Met. Las proteínas GST (control negativo) y GST-BIN2 unidas a la resina glutathione sepharose (GE healthcare) se incubaron durante toda la noche a 4°C con las proteínas PIF4 y BES1, en el tampón de unión: 20 mM Tris-HCl, pH8, 75 mM NaCl, 0,1% NP40 y 0,05% deoxicolato. La resina se lavó seis veces con el tampón de unión y las proteínas unidas se eluyeron calentando las muestras a 94°C en el tampón de carga 2xSDS. Las proteínas se corrieron en un gel SDS-PAGE al 8%, el gel se tiñó con azul de *coomassie* y se secó en un secageles durante 2 horas a 65°C. La radioactividad incorporada por las proteínas se analizó mediante el sistema de detección *FX molecular imager system* (Biorad) y el programa *Image Quant* (Biorad).

Análisis de expresión de proteínas mediante Western Blot

Para la extracción de proteínas, se homogeneizaron de 10 a 20 plántulas (dependiendo del experimento) en tampón de extracción (1xPBS, 0.1% SDS, Triton X-100) con 100 μM PMSF, 5 mM β -mercaptoetanol e inhibidores de proteasas (Roche). Los extractos se centrifugaron dos veces a 4°C durante 15 min, y la concentración de las proteínas en el sobrenadante se determinó mediante Bradford (Protein Assay Bio-Rad Lab GmbH München, Germany) por comparación con una curva patrón de BSA. Se cargaron 50 μg de proteína por cada línea. Las muestras se calentaron a 94°C en tampón de carga TMx2 con 10% β -mercaptoetanol (Tris-HCl 0,125M pH 7,4, Glicerol 20%, SDS 4%, azul de Bromofenol 0.04%) durante 5 min y se separaron en geles de SDS-PAGE al 8-12%. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman) mediante transferencia semi-seca con el tampón de transferencia: 1,46 g Tris; 0,73 g de Glicina; 0,3 mL SDS (stock 20%) y 50 mL Metanol en 250 mL de H_2O miliQ. Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau para asegurar que los pocillos contenía cantidades iguales de proteína. Posteriormente se saturaron en medio 1xTBS 0.1% Tween20 +10% de leche en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 5 min cada uno con 1xTBS, 0.1% Tween20, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario. Para análisis de proteínas fusionadas a GFP se usó el anticuerpo monoclonal anti-GFP (Roche Cat. No. 11 814 4460001) a una dilución 1/1000. Para las fusiones a HA se usó un anticuerpo monoclonal anti-HA conjugado con peroxidasa (Roche Cat. No. 12 013 819 001). Se incubaron las membranas con el anticuerpo primario en 1xTBS 0.1% Tween20 durante 4 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C y después se hicieron 3 lavados con 1xTBS 0.1% Tween20 de 5 min cada uno, y otros 3 lavados de 5 min con 1xTBS para las membranas con el anticuerpo HA conjugado a

peroxidasa. A las membranas incubadas con anti-GFP se les añadió el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Para la detección de las fusiones a GFP se usó un anticuerpo anti-mouse IgG (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden) a una dilución 1/5000 en 1xTBS 0.1% Tween20. Las membranas se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario, después se lavaron 3 veces con 1xTBS 0.1% Tween20 durante 5 min y 3 veces con 1xTBS 5 min. Después de los lavados se procedió a la detección del anticuerpo mediante la incubación durante 3 min con la solución de quimioluminiscencia SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce Thermo Scientific), después se expuso una película de autorradiografía entre 2 y 15 min.

Expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana*

La expresión transitoria en *Bentthamiana* se usó tanto para hacer estudios de análisis de expresión de proteínas como para ensayos de Coinmunoprecipitación de proteínas, ensayos luciferasa y BiFC.

Para la agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana* se utilizó la cepa C58C1 de *Agrobacterium thumefaciens*. Los plásmidos de interés se transformaron en esta cepa mediante choque térmico (Endo et al., 2005). Para la agroinfiltración de los plásmidos de interés se usaron plantas de *N. benthamiana* con 4-5 hojas crecidas en el invernadero. Los plásmidos transformados en las células de *Agrobacterium* se crecieron en cultivos de YEB + Rif + Ab^R durante la noche y se infiltraron al día siguiente mediante la ayuda de una jeringuilla en el envés de la hoja (Kahook et al., 2010). A los 2-3 días de la agroinfiltración, se tomaron discos de hojas para los ensayo luciferasa, se tomaron muestras para observar BiFC en el confocal o se congelaron las hojas en N₂ líquido para los análisis de expression de proteínas y CoIP.

Coinmunoprecipitación de proteínas (CoIP)

Para el ensayo CO-IP se recogieron hojas de *Nicotiana benthamiana* que expresaban las proteínas de interés. Se hizo un cross-link con las hojas recogidas con 1% de formaldehído manteniendo el vacío durante 15 min, la reacción se paró añadiendo Glicina con una concentración final 125 mM incubando al vacío 5 min más. Después de hacer el cross-link las hojas se lavaron 2 veces con agua, se secaron bien con papel absorbente y se congelaron en N₂ líquido. Las muestras se homogeneizaron en el tampón de extracción (Tris-HCL 20 mM, pH 7,5, NaCL 75 mM, Nonidet P-40 0,1%, Deoxicolato sódico 0,05%, β-mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1mM, inhibidores de proteasas (Roche) y MG132 10 μM). Los extractos se centrifugaron dos veces a 13000g durante 15 min a 4°C y los sobrenadantes se guardaron para el análisis mediante Western blot y para el ensayo de co-inmunoprecipitación. Para realizar el ensayo CoIP se

añadieron 50 μ L de bolas magnéticas μ MACSTM anti-tag MicroBeads (Miltenyi Biotec, anti-HA #130-091-122 o anti-GFP #130-091-125, dependiendo del tag fusionado a la proteína de interés) a los extractos de hoja y se incubó durante 3 horas a 4°C. Después, se cargó el extracto con las bolas en la Columna de Separación 20 μ MACS® (Miltenyi Biotec, # 130-042-701) colocada en el separador μ MACS (Miltenyi Biotec, #130-042-602) que se había equilibrado previamente con 200 μ L de tampón de extracción. Se lavaron las bolas magnéticas 5 veces con 500 μ L de tampón de extracción y se eluyó con 50 μ L de tampón de carga TMx2 con 10% β -mercaptoetanol previamente hervido a 95°C. Se cargaron 30 μ g de proteína en un gel SDS-PAGE que se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Whatman) para el análisis por Western blot. Los anticuerpos usados para la detección fueron anti-HA-Peroxidasa (Roche) y anti-GFP-Peroxidasa (Miltenyi Biotec).

Ensayo de Complementación Bimolecular fluorescente (BiFC)

Para llevar a cabo los ensayo de BiFC se utilizaron los plásmidos YFP de complementación, pYFP^N y pYFP^C (Belda-Palazon et al., 2012). Las construcciones para BiFC con PIF4 y BIN2 se generaron mediante el sistema Gateway utilizando el pENTRYTM correspondiente. Para comprobar la interacción se agroinfiltraron las construcciones con sus respectivos controles en hojas de *Nicotiana benthamiana*. 12 horas antes de su análisis mediante microscopia confocal se infiltró MG132 15 μ M (Liu et al., 2010) en las hojas previamente infiltradas. Los núcleos positivos que expresaban YFP se fotografiaron.

Ensayo de actividad Luciferasa

Para los estudios de actividad luciferasa en plántulas de *Arabidopsis* las semillas se plaquearon en medio MS sólido. 3 días después de la germinación, las plántulas se transfirieron cuidadosamente a microplacas de 96 pocillos (Corning Inc., COSTAR 3362) con 175 μ L de medio MS sólido y 35 μ L de sustrato 1x D-Luciferin (SIGMA #L9504) en cada pocillo. Las microplacas se sellaron con una película transparente (Kisker GbR, PCR-folie ultra clear RT-PCR, G060/UC-RT) y cada pocillo se perforo dos veces con una aguja de 0,3 mm para permitir el intercambio de gases. Antes de medir la actividad luciferasa se dejó que las plántulas se aclimatasen durante 12 horas. Los niveles de actividad luciferasa se mediaron cada hora durante un total de 3-5 días, mediante el LB 960 Microplate Luminometer (Berthlod). Los valores registrados representan la media de cuentas por segundo en cada pocillo, durante dos segundos sucesivos, con al menos 12 plantas por línea. La media de los valores de los 12 replicados se graficaron como una estimación de los niveles de la actividad luciferasa en estas plantas. El luminómetro se colocó en una cámara de

crecimiento para mantener las plantas en condiciones controladas de crecimiento, y para permitir crecer las plantas en fotoperiodos de SD/LD o en condiciones de luz continua. El luminómetro esta equipado con software robótico programado para dejar las placas fuera del aparato entre una medición y otra, para minimizar la interferencia con condiciones diurnas, y esta operado con el software Windows® PC MikroWin 2000.

Para ensayos de transactivación, las hojas de *N. benthamiana* se coinfiltraron con las cepas de *Agrobacterium* que contenían las construcciones deseadas. Dos días después de la agroinfiltración se recogieron discos de 1cm de diámetro de las hojas con ayuda de un sacabocados y se transfirieron cuidadosamente con la parte abaxial hacia arriba a microplacas de 96 pocillos con 175 µL de medio MS sólido y 35 µL de sustrato 1x D-Luciferin. Se usó un disco por pocillo y se hicieron al menos 12 replicas por ensayo. Las placas se sellaron con película transparente y se midió como se ha descrito anteriormente.

D-Luciferin substrate (SIGMA, #L9504): la solución stock se prepare disolviendo 10 mg de D-luciferin en 1 mL de DMSO, las alícuotas de 8 µL se guardaron a -80°C. cada una de las alícuotas se diluyó en 4 mL de agua estéril para preparar una solución de trabajo de 0,02 mg/mL D-luciferin.

Ensayo de doble híbrido (YTH)

Los experimentos de doble híbrido se hicieron con el sistema MATCHMAKER GAL4 Yeast Two-Híbrido System (Clontech, Cat No. K1604-1, K1605-1, 630303) y se usó la cepa AH109 de *Sacharomyces cerevisiae* (Clontech) para transformar los plásmidos. Las diferentes construcciones fueron co-transformadas en GAL4-BD y GAL4-AD mediante el sistema transformación de LiAc descrito en Yeast Protocols Handbook (Clontech, PT3024-1). Las células se seleccionaron para ambos plásmidos, pGADT7 y pGBKT7, en medio **SD-LT** [SD Minimal Agar Base (Clontech, No. 630412) con -Leu/-Trp DO Supplement (Clontech, No. 630412)]. Después de incubar los cultivos toda la noche, las células se plaquearon en medio **SD-LTH** [SD Minimal Agar Base con -Leu/-Trp/-His/-Ade DO Supplement (Clontech, No. 630412) y con 0,003% de Adenina] y **SD-LTHA** [SD Minimal Agar Base con -Leu/-Trp/-His/-Ade DO Supplement (Clontech, No. 630428)] para comprobar las interacciones.

Microscopía Confocal

Las muestras de hojas agroinfiltradas en *N. benthamiana* se analizaron en un microscopio confocal espectral LEICA TCS SP5 (Leica Microsystems). La fluorescencia se detectó con una excitación Beam Splitter FW (TD 488/561/633) y un objetico HCX PL APO lambda blue 63.0x1.20 WATER UV. Para detectar GFP (YFP) se usó una ancho de banda de 508nm-573nm y para la

clorofila de 652nm-751nm.

Para la detección de GFP en plántulas de *Arabidopsis*, se usaron plantas con 4-5 días de edad. Las plántulas se recogieron cuidadosamente del medio con las pinzas y se incubaron durante 30 segundos con una solución 1x de Yoduro de Propidio (PI). Se lavaron con agua estéril y se montaron en un porta con un 10% de glicerol. La fluorescencia se detectó en un microscopio Zeiss Axiovert 200, usando Radiance 2100 Laser Scanning System (Bio-Rad) en combinación con una división de haz 560 DCLPXR y un filtro de emisión HQ515/30. La clorofila se filtró con HQ 660LP y se visualizó con un laser de Argón ($\lambda=448$). Las imágenes se procesaron con los software LaserSharp v5.0 (Bio-Rad) y LaserPix v.4 (Bio-Rad).

Extracción de ARN y qRT

Para el análisis de ARN, el material congelado en eppendorfs fue homogeneizado con la ayuda de un taladro eléctrico (IKA, 2572200) y extraído con 300 μ L de buffer Z6 (Guanidina-HCl 8M, MES pH 7 20 mM, EDTA 20 mM y 10% β -mercaptoetanol). Se añadió un volumen de fenol-cloroformo al extracto y se mezcló bien con ayuda del vortex. La mezcla se centrifugó a 1300 rpm durante 30 minutos a 4°C y se recogió la parte superior acuosa en un tubo nuevo. El ARN de esta fracción fue purificado con el High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Ref.11828665001), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó en el NANODROP. Para la síntesis de cDNA se usaron 2 μ g del ARN total para la transcripción con el Transcriptor First strand cDNA synthesis kit (Roche, 04379012001). La reacción de cDNA se diluyó 1:10 en agua y se usó para el análisis de qPCR con los cebadores específicos para los genes de estudio. Para llevar a cabo la reacción de qPCR se usó FastStart Universal SYBR Green Master Mix (ROCHE # 04913850001), con el gen PP2A como control interno. Las reacciones de qPCR se realizaron en el termociclador 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, #4351105) y los datos amplificados se analizaron con el software 7500 v2.0.

Análisis de micromatrices

Para el análisis de expresión de *PIF4OX*, se crecieron las plantas Col-0 y *PIF4OX* en luz roja continua (flujo: 35 μ mol m⁻²s⁻¹) durante 7 días a 22°C. Se extrajo el ARN total de las plantas con el kit High Pure RNA Isolation kit (Roche) y se usaron tres réplicas biológicas para los estudios de expresión. El marcaje de ARN y la hibridación de la micromatriz se realizó según lo descrito (Adie et al., 2007). La corrección de fondo y la normalización se realizaron usando el paquete LIMMA (Smyth and Speed, 2003). Se consideró que los genes se expresaban de forma diferencial cuando el valor corregido P era <0.05 y el incremento era mayor de dos veces. Los

genes expresados diferencialmente en el mutante *pifq* de obtuvieron de (Leivar et al., 2009; Zhang et al., 2013). Los genes inducidos por tratamiento con BL se obtuvieron de (Goda et al., 2008; Goda et al., 2004; Nemhauser et al., 2006; Nemhauser et al., 2004; Vert et al., 2005). Los genes reprimidos en el mutante *bri1-116* están descritos en (Sun et al., 2010). Los diagramas de Venn se representaron empleando la herramienta Biovenn (<http://www.cmbi.ru.nl/cdd/biovenn/index.php>) y la representación gráfica se realizó empleando el software MeV TIGR (<http://www.tm4.org/mev/>).

Tabla 6. Lista de cebadores.

	NOMBRE	SECUENCIA	OBSERVACIONES
1	Actine8f	GACTCAGATCATGTTTGAGACCTTT	qPCR
2	Actine8r	CCAGAGTCCAACACAATACCG	qPCR
3	APBPIF4r	GCTCTAGAGGCCACAAAAGGAAGAGTAG	PIF4Del1
4	AtPIF4Del3f	CACCGGATCAAACCGAAGGAGTCG	PIF4Del3
5	AtPIF4Del4f	CACCGTGATGTGGATGGGGAGTGG	PIF4Del4
6	AtPIF4Del5r	AGCCGCCGCCGCCG	PIF4Del5
7	BES1f	CACCGAATTCATGACGTCTGACGGAGCAACG	BES1
8	BES1r	ACCCGGGCAACTATGAGCTTTACCATTTC	
9	BIN2f	CACCGAATTCATGGCTGATGATAAGGAGATG	BIN2
10	BIN2r	AGTTCCAGATTGATTCAAGAAG	
11	BIN2GSTr	TGGGATCCAGTTCCAGATTGATTCAAGAAG	BIN2-GST
12	<i>bin2-1f</i>	CTGGTCTGCTGGTTGTGTTT	Genotipar <i>bin2-1</i>
13	<i>bin2-1r</i>	TGCATCTTAGACTTGGAGAG	
14	PIF4glyf	TCATATGGAACACCAAGGTTGGAGTTTTGAGGAGAAT TATAGTTTGT	PIF4 con cola de glicinas
15	PIF4glyr	AGAATTCAAGCCTCCCCGCCTCCGTGGTCCAAACGA GAACC	
16	Pif4Promoterf	CACCCAGTACGCATCCAATCTTCTC	Para clonar promotor PIF4
17	Pif4Promoterr	CGGGATCCGGGTACAGACAGAAAGTGAC	
18	Pif4BamHlf	CGGGATCCGACATGGAACACCAAGGTTGG	
19	PIF4YFPf	CACCATGGAACACCAAGGTTGG	PIF4
20	PIF4YFPPr	TCCGTGGTCCAAACGAGAACCGTC	
21	PIF4sinAPBf	CACCATGCTTGAAGATCAAGAACTGTC	PIF4Del2
22	PIF41Af	CGGTAACGgaCGTTGGACCTgaCCATTGCGGAgacaAC CCATCAC	PIF41A
23	PIF41Ar	GTGATGGGTTGtcTCCGCAATGGtcAGGTCCAACGtc GTTACCGAG	
24	PIF42Af	CATCAGGGTGGCgCCgCTGGTTGCAGCTTTGG	PIF42A
25	PIF42Ar	CCAAAGCTGCAACCAGcGGcGCCACCTGATGAGG	
26	qPIL1f	TATGCGGACCCTTCAACTTC	qPCR
27	qPIL1r	GGCAACATCGTAGGTGGTCT	qPCR
28	qPP2Af	TAACGTGGCCAAAATGATGC	qPCR
29	qPP2Ar	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	qPCR
30	qPRE5f	TGCTTCGAGGATCTCCGATGACCA	qPCR
31	qPRE5r	GCCGTTCTGTGAATCTCCGGCA	qPCR
32	qXTR7f	TGGCGACTGTTCTTCTTGTG	qPCR
33	qXTR7r	TCCTCCGTTGAAGATTTTGC	qPCR

RESULTADOS

Las plantas necesitan una ruta de señalización de BRs activa para responder correctamente a GA

Los mutantes insensibles a GAs, *sly1-10* y *gai1*, presentan una baja eficiencia de germinación que mejora con la aplicación de brasinólido (BL) (Steber and McCourt, 2001). Durante estos tratamientos se observó que la aplicación de BL no sólo mejora la germinación sino que además recupera el fenotipo enano de estos mutantes, así como el de los mutantes *ga1-3*, deficientes en GAs (Figura 12A). En estos estudios comprobamos también que la aplicación de GAs no afecta el crecimiento del hipocotilo de los mutantes insensibles *gai1.1* y *sly1.10*, los cuales muestran hipocotilos igual de cortos en presencia que en ausencia de GAs. Sin embargo, las GAs si son capaces de recuperar el crecimiento del hipocotilo de las plantas *ga1.3*, deficientes en GAs, debido a que revierten el bloqueo en la síntesis de GAs (Figura 12A). Este hecho pone de manifiesto que los BRs inducen una elongación del hipocotilo en plantas que acumulan niveles elevados de las DELLAs, debido a un bloqueo en la síntesis o señalización de GAs.

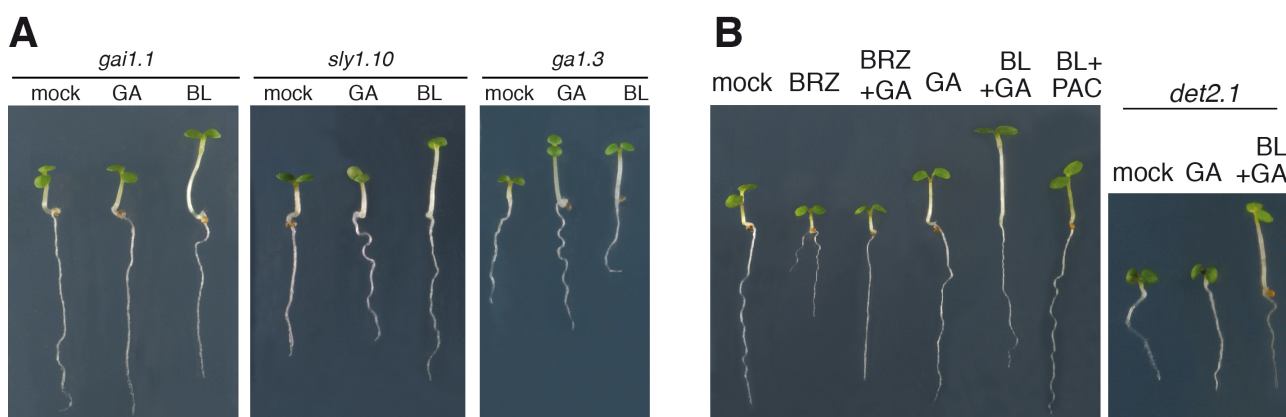


Figura 12. Los brasinosteroides (BRs) revierten el fenotipo enano producido por la acumulación de las proteínas DELLA. (A) La aplicación de brasinólido (BL) no solo mejora la germinación de los mutantes *gai1.1* y *sly1.10*, insensibles a giberelinas (GAs), y la del mutante *ga1.3*, deficiente en GAs, sino que promueve el crecimiento del hipocotilo, revirtiendo el fenotipo enano de estos mutantes. **(B)** Los BRs recuperan el fenotipo enano de las plantas que han sido tratadas con *paclobutrazol* (PAC), un inhibidor de la síntesis de GA. Las GAs, por el contrario, no inducen el crecimiento del hipocotilo en el mutante *det2-1* (deficiente en BRs) ni en plantas tratadas con *brassinazole* (BRZ), un inhibidor de la síntesis de BR. La aplicación conjunta de GAs y BRs provoca un crecimiento mayor del hipocotilo que cuando se aplican las hormonas de forma independiente. Las plantas se trataron con 0.5 μ M PAC, 25 μ M GA₃, 0.5 μ M BRZ, 1.0 μ M BL.

RESULTADOS

Asimismo, los BRs recuperan la elongación del hipocotilo de plantas que han sido tratadas con *paclobutrazol* (PAC), un inhibidor de la síntesis de GA. Las GAs, por el contrario, no promueven el crecimiento de los mutantes *det2-1*, deficientes en BRs (Li et al., 1996), ni el de plantas silvestres tratadas con *brassinazole* (BRZ), un inhibidor de la síntesis de BRs (Nagata et al., 2000) (Figura 12B). En presencia de este inhibidor se reprime el crecimiento del hipocotilo, y las plantas muestran un fenotipo igual al de los mutantes insensibles o deficientes en BRs. Este fenotipo no se recupera por aplicación de GAs, aunque la aplicación exógena de BL sí mostró ser capaz de recuperar la elongación del hipocotilo en plantas tratadas con *paclobutrazol*. Por otra parte, la aplicación conjunta de ambas hormonas, GAs y BRs, provoca un efecto sinérgico sobre el crecimiento del hipocotilo, que es mucho mayor que cuando se aplican las hormonas de forma independiente (Figura 12B).

Resultados similares han sido publicados recientemente por Bai *et al* (2012), e indican que las plantas requieren una ruta de señalización de BRs activa para responder correctamente a los efectos de las GAs (Figura 12).

A fin de determinar en qué etapa de la transducción de la señal de GAs ocurre esta regulación cruzada, decidimos analizar si la aplicación de BL afecta a los niveles de acumulación del receptor de GAs, GID1a. Para ello usamos líneas transgénicas GID1a-GFP (Willige et al., 2007), las cuáles se trataron con PAC, GA, BRZ, BL, BRZ + GA, o BL +GA. Ninguno de las combinaciones de hormonas o inhibidores mostraron modificar los niveles de la proteína GID1a-GFP, lo que indica que los BRs no actúan afectando a la estabilidad del receptor GID1 (Figura 13A).

A su vez, generamos líneas transgénicas *pRGA::GFP-RGA det2-1* para ver si la desestabilización de este represor se mantiene en un fondo deficiente en BRs. Estas plantas se germinaron en medio MS y en medio MS suplementado con GAs (25 μ M GA₃) o con PAC (0,5 μ M PAC) y a los 5 días se recogió el material para analizar los niveles de acumulación de proteína tras los distintos tratamientos. Como se aprecia en la Figura 13B, la desestabilización de la proteína GFP-RGA es similar en la línea *det2-1* a la descrita para plantas silvestres. En el fondo mutante *det2.1*, el represor RGA se acumula a niveles más altos en plantas tratadas con PAC, mientras que se desestabiliza en plantas crecidas en presencia de GAs, lo que demuestra que la ruta de BRs no afecta a la degradación de este represor, inducida por GA. Obtuvimos también resultados similares cuando estos estudios se llevaron a cabo en plantas silvestres y en el mutante *det2-1*, en las que se detectó la proteína RGA endógena mediante western-blot con un anticuerpo generado contra la proteína (cedido por C. Schwechheimer), tras distintos tiempos de aplicación de GAs (Figura 13C). De esta forma excluimos la posibilidad de que los resultados obtenidos fueran

RESULTADOS

debidos a una respuesta anómala de la proteína de fusión GFP-RGA. Sin embargo, es notable destacar que en el fondo *det2-1*, la desestabilización de las DELLAs no recupera el fenotipo enano de estas plantas, lo que apoya la idea de que los BRs tienen un papel regulador por debajo de las DELLAs.

En consonancia con estos resultados, encontramos que la aplicación de BZR reprime el crecimiento de los mutantes *tetra* y *global*, con una pérdida de función de 4 o todos los genes DELLA (*gai-t6*, *rga-t2*, *rgl1-1*, *rgl2-1* y *rgl3-4*). El mutante *global* muestra un hipocotilo más alargado que las plantas silvestres, y el crecimiento de éste no se reprime en respuesta a la aplicación exógena de PAC, lo que estaría de acuerdo con otras evidencias experimentales que indican que este mutante presenta una respuesta constitutiva a GAs. Sin embargo, el crecimiento del hipocotilo se inhibe en estas plantas, cuando se crecen en BZR. Por otra parte, en presencia de BL, los hipocotilos muestran un tamaño exagerado, similar al que se observa en Col-0 cuando se trata conjuntamente con GA y BL (Figura 13D), lo que corrobora de nuevo la respuesta constitutiva a GA de estos mutantes. Así, estos resultados apoyan la idea de que las rutas de GA y BRs convergen en algún componente de señalización cuya función es necesaria para la elongación del hipocotilo, por debajo de las DELLAs.

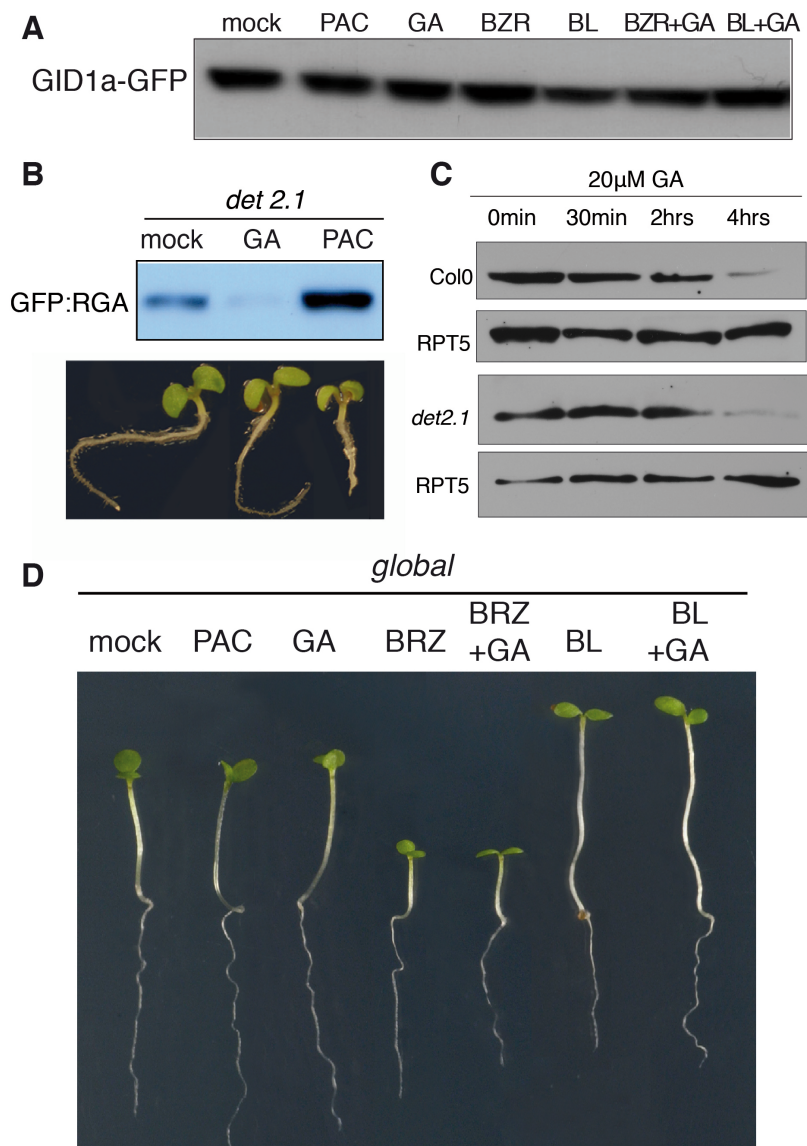


Figura 13. Las rutas de señalización de BRs y GAs convergen en un componente regulador que se encuentra por debajo de las DELLAs. (A) Ninguno de los tratamientos con hormonas o inhibidores afectan la estabilidad del receptor de GAs, GID1. En las líneas transgénicas GID1a-GFP, la aplicación combinada de inhibidores y BRs o GAs, no modifican los niveles de este receptor. (B) Se generaron líneas transgénicas pRGA::GFP-RGA *det2-1* para ver si la desestabilización de las DELLAs se ve afectada en un fondo deficiente en BRs. La degradación de la proteína GFP-RGA en presencia de GAs, es equivalente en la línea *det2-1* y en las plantas silvestres. En el fondo *det2.1*, RGA se acumula a niveles superiores en plantas tratadas con PAC, y se degrada tras la aplicación de GAs. (C) Las plantas GFP-RGA se trataron con GAs (25 μM GA₃) y se recogieron a distintos tiempos (0 min, 30 min, 2 hrs y 4 hrs). Se usó un anticuerpo específico contra la proteína RGA (cedido por C. Schwechheimer) y se obtuvieron resultados idénticos a los mostrados en el apartado (B), excluyendo así la posibilidad de una respuesta anómala de la fusión GFP-RGA. (D) El mutante *global*, con una pérdida de función en los 5 genes DELLA (*gai-t6*, *rga-t2*, *rgl1-4*), muestra un hipocotilo más alargado que las plantas silvestres, y su crecimiento no se inhibe por la aplicación exógena de PAC, por lo que muestra una activación constitutiva de la ruta de GAs. Estos mutantes muestran aún un fenotipo enano cuando crecen en BRZ, mientras que la aplicación de BL provoca un crecimiento exagerado del hipocotilo, similar al que se observa en Col-0 cuando se trata conjuntamente con GA y BL. Las plantas se trataron con 0.5 μM PAC, 25 μM GA, 0.5 μM BRZ, 1.0 μM BL.

Los BRs promueven la acumulación de una forma de PIF4 con mayor migración electroforética

Las proteínas DELLA reprimen la elongación del hipocotilo al unirse a los factores PIFs, a través del dominio de interacción al ADN (dominio bHLH), impidiendo la unión de estos factores a los promotores de sus genes diana (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008). Puesto que los estudios fisiológicos anteriores indicaban que los BRs promueven la elongación celular en mutantes que acumulan las DELLAs, y que las GA inducen la degradación de estos represores, pero no la elongación del hipocotilo en el mutante *det2-1*, concluimos que los BRs podrían estar actuando directamente a nivel de los PIFs. Para testar esta posibilidad, generamos líneas transgénicas que expresaban la proteína PIF4 fusionada al epítipo HA, y las tratamos con BL (0,5 μ M BL) y BRZ (0,5 μ M BRZ), a fin de analizar si estos tratamientos afectaban la estabilidad de la proteína PIF4. Como se muestra en la Figura 14A, observamos que tras la aplicación de BL, la proteína PIF4-HA se acumula en condiciones de oscuridad a niveles superiores, lo que indica que los BRs estabilizan este factor. El tratamiento con BRZ reduce los niveles de PIF4, y este efecto no se observa si las plantas se tratan previamente con el inhibidor del proteasoma, MG132 (10 μ M MG132). Por otra parte, la estabilización de la proteína PIF4-HA se traduce también en un cambio en la movilidad electroforética de la proteína, en el que la banda de migración mayor podría corresponder a una forma no fosforilada de este factor (Figura 14A y 14B). Para comprobar que efectivamente este cambio en la migración se corresponde con un cambio en el estado de fosforilación de la proteína, incubamos los extractos de plantas mock, y plantas tratadas con BL y BRZ, con fosfatasa CIP (*calf-intestinal phosphatase*), y analizamos si estos tratamientos modificaban la movilidad de la proteína en geles SDS-PAGE. En la Figura 14B vemos como tras el tratamiento con la fosfatasa CIP solo aparece una banda de mayor movilidad, que corresponde a la proteína no fosforilada, lo que demuestra que las bandas de distinta movilidad corresponden a las formas fosforiladas y no fosforiladas de la proteína.

Estos resultados indican que los BRs estabilizan a PIF4 mediante la inhibición de una proteína quinasa responsable de fosforilar a este factor y marcarlo para su degradación por el sistema proteasoma.

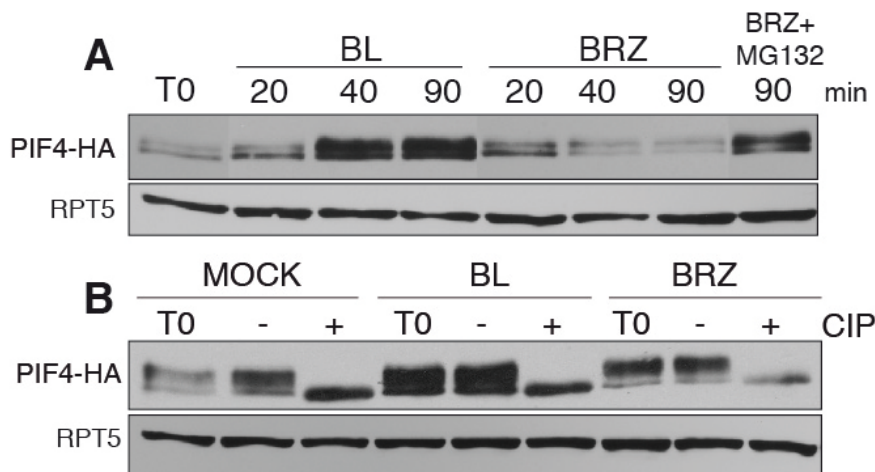


Figura 14. Los BRs promueven la acumulación de la forma no fosforilada de PIF4. (A) El tratamiento con BL produce la estabilización de la proteína PIF4-HA en oscuridad, observándose ya una respuesta tras 40 minutos de aplicación de la hormona. El tratamiento con BRZ reduce los niveles de PIF4 y este efecto es revertido por la aplicación previa del inhibidor de proteasoma, MG132. La estabilización de PIF4 se asocia a un cambio en la movilidad electroforética de la proteína. (B) Los extractos de plantas crecidas en medio MS (mock), o tratadas con BL o BRZ, se incubaron durante 30 min con 0,3 μ L de fosfatasa CIP (*calf-intestinal phosphatase*). Este tratamiento induce la desaparición de la banda de menor movilidad y sólo se mantiene la de mayor migración, que corresponde a la forma no fosforilada de la proteína. Las plantas se trataron con 0,5 μ M BL, 0,5 μ M BRZ y 10 μ M MG132.

Las líneas sobre-expresoras de PIF4 muestran una respuesta hiposensible a BRZ y niveles altos de expresión de genes regulados por BR

Si los BRs modulan la estabilidad de los factores PIFs, esperaríamos que las líneas sobre-expresoras o mutantes en estos genes mostraran una respuesta alterada a estas hormonas. Así, una sobre-acumulación de PIF4 debería mostrar los mismos efectos que produce la aplicación de BL, y mostrar una respuesta parcialmente insensible a BRZ. Como se muestra en la Figura 15A y 15B, las plantas *PIF4OX* crecidas en BRZ son en efecto más altas que los controles silvestres y además muestran una respuesta exagerada a BL. Por el contrario, las plantas *pif4pif5*, muestran una respuesta hiposensible a BL y son hipersensibles a BRZ. La sensibilidad alterada de estas plantas a BL se hace incluso más patente tras una aplicación conjunta de GA y BRZ. En las plantas silvestres, la aplicación de BRZ bloquea la elongación del hipocotilo inducida por las GAs, en tanto que el mutante *det2-1* es totalmente insensible a GA. Por el contrario, como se aprecia en la Figura 15C, en las plantas *PIF4OX* o el mutante *phyB*, que acumula niveles altos de los PIFs, las GAs son capaces de inducir la elongación del hipocotilo aún en presencia del inhibidor BRZ. De hecho, estas plantas muestran un hipocotilo más alargado tras la aplicación de GA + BRZ (25

RESULTADOS

μM GA + 0,5 μM BRZ) que el mutante *bes1-D*, con una respuesta constitutiva a BRs (Yin et al., 2002). En este mutante observamos que la aplicación de BRZ no inhibe el crecimiento del hipocotilo, pero en los tratamientos con GA + BRZ o GA los hipocotilos son más cortos que los de las plantas *PIF4OX* y *phyB* (Figura 15C).

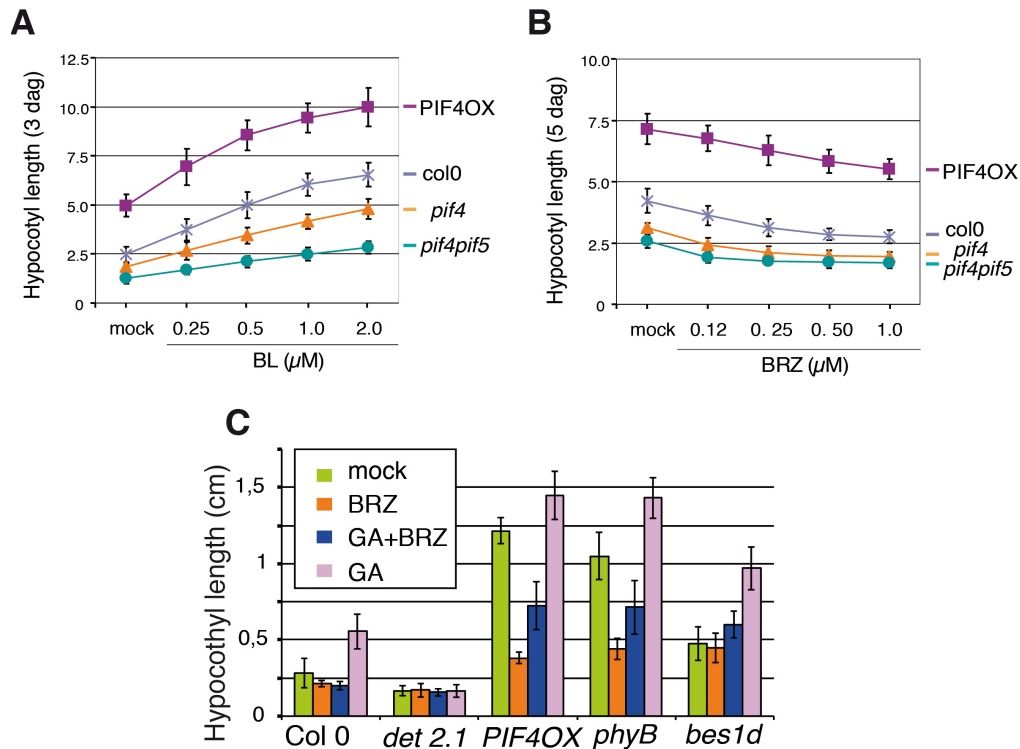


Figura 15. Las líneas que acumulan niveles elevados de PIF4 muestran una respuesta hiposensible a BRZ. (A) La línea *PIF4OX* se caracteriza por mostrar unos hipocotilos más alargado y en respuesta a BL el crecimiento del hipocotilo se satura antes que en las plantas *Col-0* o los mutantes *pif4* y *pif4pif5* **(B)** Las plantas *PIF4OX* crecidas en BRZ son más alargadas que el control silvestre *Col-0* y que los mutantes *pif4* y *pif4pif5*, y a 1.0 μM BRZ no se ha alcanzado una saturación en la respuesta **(C)** El tratamiento con BRZ inhibe la elongación del hipocotilo tanto en *Col-0* como en *PIF4OX* y *phyB*, mientras que las líneas *bes1-D*, con una respuesta constitutiva a BR, no se ven afectadas por el inhibidor. El tratamiento con BRZ + GA, no revierte el efecto de BRZ en la planta silvestre. Sin embargo, en las plantas *PIF4OX* y en el mutante *phyB* sí provoca un aumento en la elongación del hipocotilo, similar al efecto que se produce en *bes1-D* (Yin et al., 2002). Los mutantes *det2-1*, deficientes en BRs, no responden ni a GAs, ni a BRZ, mostrando un fenotipo enano en todos los tratamientos. Las plantas se trataron con 25 μM GA, 0,5 μM BL y 0,5 μM BRZ.

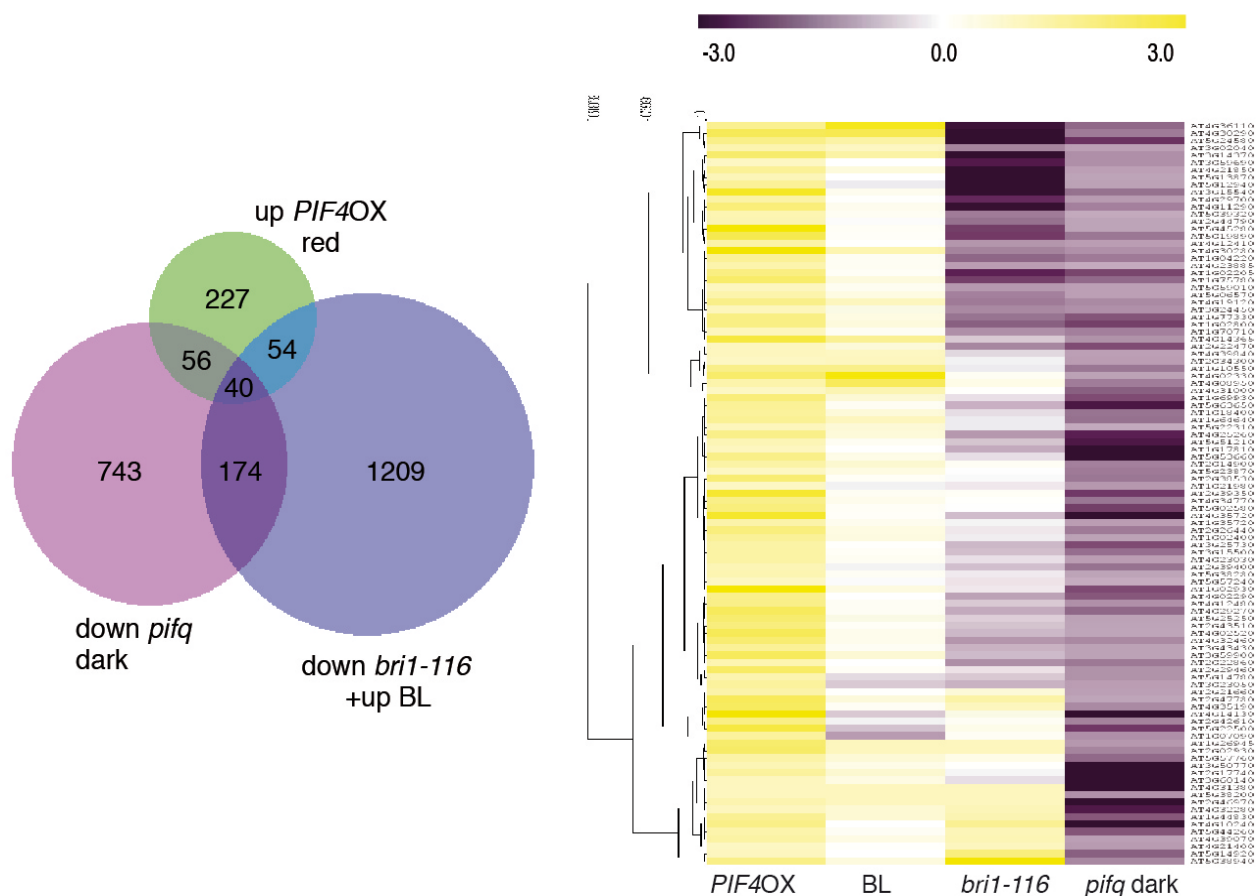


Figura 16. Los genes inducidos por PIF4 están regulados positivamente por los brasinosteroides. El diagrama de Venn muestra un solapamiento de los genes inducidos en las plantas transgénicas *PIF4OX*, los reprimidos en el mutante *pifq* y los regulados por BR (genes inducidos por tratamiento con BL o reprimidos en el mutante *bri1-116*). Los genes regulados por *PIF4* que solapan con los inducidos por BRs derivan de hibridaciones de micromatrices de ADN con el ARN de plantas crecidas en las siguientes condiciones: *PIF4OX* crecidas en luz roja (*PIF4OE*), tratamiento con BL durante 3h (BL), plantas mutantes *bri1-116* y plantas mutantes *pifq* crecidas en oscuridad (*pifq*) (amarillo: genes regulados positivamente, morado: genes regulados negativamente).

Además, cuando analizamos los genes con una expresión diferencial en las líneas *PIF4OX* y el mutante *pifq*, observamos un solapamiento significativo entre los genes identificados en estas micromatrices de ADN, y los que se han reportado como inducidos tras la aplicación de BL, o que muestran una expresión menor en el mutante *bri1-116*, insensible a BRs (Figura 16). En el diagrama de Venn se aprecia que existe un solapamiento significativo entre los genes que se expresan diferencialmente en las líneas *PIF4OX* crecidas en luz roja (de Lucas et al., 2008) o las plantas *pifq* crecidas en oscuridad (Leivar et al., 2009; Zhang et al., 2013), y los genes inducidos por tratamiento con BL (Nemhauser et al., 2006; Nemhauser et al., 2004) o reprimidos en el mutante *bri1-116* (Sun et al., 2010). Como se muestra en la Figura 16, el 24,9% de los genes inducidos en *PIF4OX* y el 21,1% de los genes reprimidos en plantas *pifq* crecidas en oscuridad,

están regulados positivamente por BL (el porcentaje esperado para una coincidencia al azar es del 4,8%). Cabe también destacar que genes implicados en la modificación de la pared celular (pectinesterasas 2, 7, 41 y 44; XTHs 5, 17, 18, 19, 25, 30 y 33; y expansinas A2 y A8 o aquaporinas) y en la respuesta a auxinas (5 SAURs, IAAs 1, 3, 6, 17 y 19) se encuentran altamente enriquecidos dentro de los genes co-regulados, lo que concuerda con estudios recientes que confirman que PIF y BZR1 regulan cooperativamente estos genes diana (Oh et al., 2012).

Interacción de PIF4 con la quinasa BIN2

La GSK3 quinasa BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE-2) reprime la ruta de señalización de BRs al inhibir la actividad transcripcional de los factores BES1 y BZR1, cuya función es necesaria para la activación o represión de los genes regulados por estas hormonas. Se ha visto que, en ausencia de BRs, BIN2 fosforila estos factores, lo cual bloquea su unión al ADN, promueve la interacción de BES1/BZR1 con las proteínas citosólicas 14-3-3 y su exclusión del núcleo, y favorece la degradación de estos factores por el sistema proteasoma (Gampala et al., 2007; Vert and Chory, 2006; Zhao et al., 2002). La señalización por BRs inactiva a la quinasa BIN2, al promover que la fosfatasa BSU1 defosforile el residuo Tyr200 de BIN2, esencial para su actividad. De esta forma, los factores BES1 y BZR1 pueden acumularse en su forma no fosforilada activa, y se localizan en el núcleo, donde activan la expresión de los genes regulados por BRs (Kim and Wang, 2010). Así, BIN2 resultaba ser un buen candidato para la regulación de PIF4, ya que la inactivación BL-dependiente de esta quinasa, explicaría la de-fosforilación de este factor que observábamos tras la aplicación de BL (Figura 14).

PIF4 interacciona con BIN2 en ensayos in vitro: YTH y pull-down

A fin de determinar si las proteínas PIF4 y BIN2 interaccionan de forma directa, se realizó un ensayo de doble híbrido en levadura. La región codificante de BIN2 se amplificó por PCR y se clonó en el vector TOPO S/D, para después ser insertada mediante la reacción LR clonasa en el vector pGBKT7. Se amplificó también la región codificante de PIF4, la cual se clonó en el vector pGADT7, junto con la construcción BES1-pGADT7 que se utilizó como control positivo de la interacción, dado que se conoce que BIN2 interacciona directamente con BES1. Como se ve en la Figura 17A las proteínas PIF4 y BIN2 interaccionan en levadura, puesto que las células co-transformadas con las dos construcciones crecen en medio selectivo, en tanto que sus controles correspondientes con los vectores vacíos no lo hacen. Estudios de interacción con versiones truncadas de la proteína PIF4 (Figura 17C) mostraron que el dominio de interacción con BIN2 debe estar inmediatamente después del dominio de dimerización bHLH. En efecto, una versión

RESULTADOS

truncada de la proteína PIF4 desde la Val-312 al extremo C-terminal, muestra aún una interacción con BIN2, lo que indicaría que esta región incluye el dominio de interacción (Figura 17C y 17D). Sin embargo, cuando en la proteína completa se delecciona una parte que comprende desde el residuo 324 al extremo C-terminal, se sigue observando una unión a BIN2, lo que sugiere que existe un dominio adicional de interacción entre los residuos 107 (la región correspondiente a los 107 primeros residuos no mostró interaccionar con BIN2) y 312. Este dominio de interacción parecer actuar de forma cooperativa con el dominio situado cerca de la región C-terminal, ya que las proteínas truncadas que incluyen esta región mostraron una mayor afinidad de interacción que el dominio C-terminal (Figura 17C y 17 D).

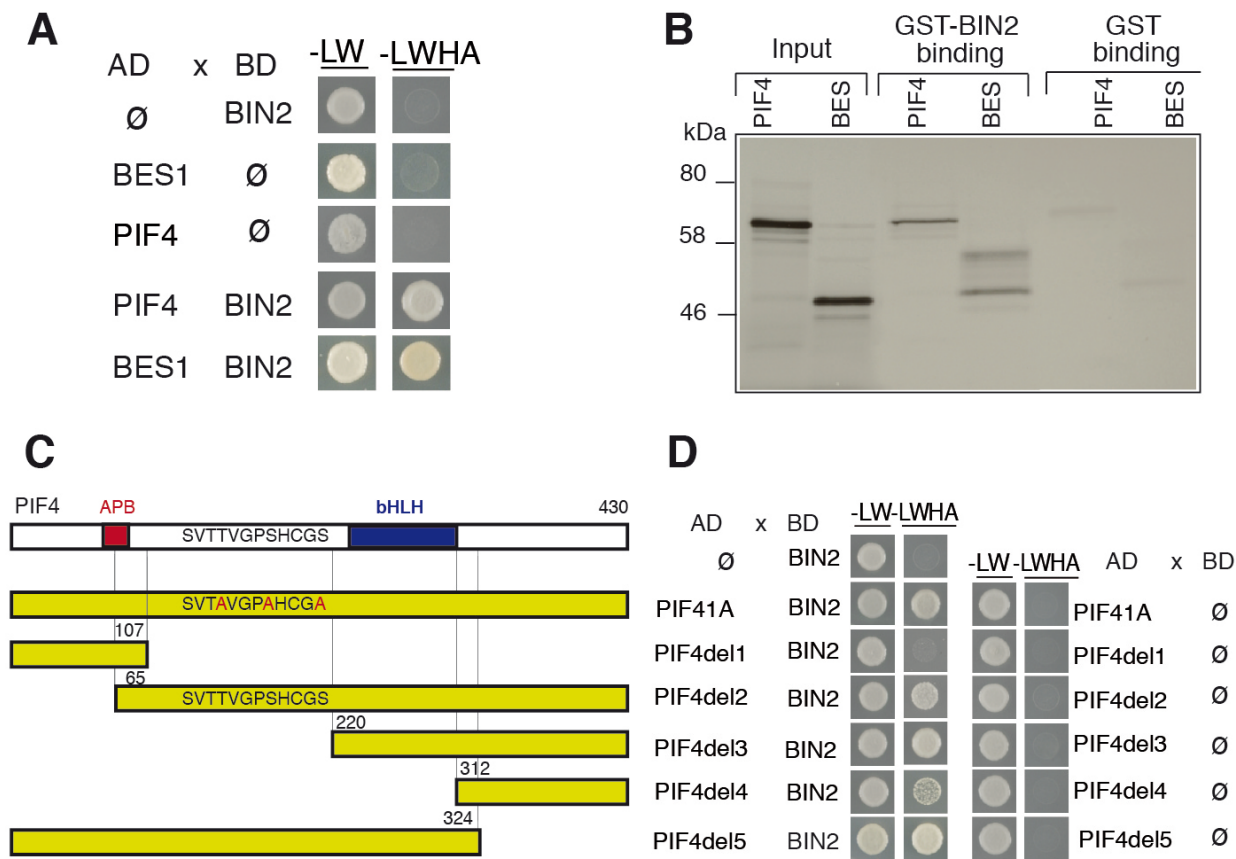


Figura 17. PIF4 interacciona con BIN2 en ensayos *in vitro* de YTH en levadura y “pull-down” *in vitro*.

(A) PIF4 interacciona con BIN2 en levadura. Como control positivo se usó BES1. **(B)** PIF4 interacciona con BIN2 en ensayo *pull-down*. Al igual que en el ensayo de doble híbrido se empleó la proteína BES1 como control positivo. Se observa que ambas proteínas interaccionan con una afinidad similar y no se unen a una columna con la proteína GST inmovilizada, que se utilizó como control negativo. **(C)** Delecciones de la proteína PIF4 empleadas para mapear los dominios de interacción con BIN2. **(D)** Los ensayos de interacción con estos diferentes fragmentos indican que PIF4 se une a BIN2 a través de 2 regiones independientes, una situada entre los residuos 107 y 324, y una segunda entre los residuos 312 y 430. La primera de estas regiones interacciona con una mayor afinidad

RESULTADOS

La interacción directa entre estas proteínas se confirmó también mediante ensayos de *pull-down*. Para ello se marcó con ³⁵S Met las proteínas PIF4 y BES1 (se usó de nuevo como control positivo de la interacción) y el producto de traducción *in-vitro* se pasó a través de una columna de glutatión-Sepharose en la que se había inmovilizado la proteína GST-BIN2. En la Figura 17B se aprecia que ambas proteínas son retenidas con afinidades similares en la resina de Sepharosa con la proteína GST-BIN2 unida, mientras que en una columna a la que se unió sólo la proteína GST, como control negativo de interacción, apenas se detecta una unión de estas proteínas. En base a estos ensayos podemos pues concluir que las proteínas PIF4 y BIN2 interaccionan directamente *in vitro*.

PIF4 interacciona con BIN2 en ensayos in vivo: CoIP y BiFC

Para confirmar que esta interacción ocurre también en la planta, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación y complementación bimolecular (BiFC) *in-vivo*. Para los ensayos Co-IP se expresaron las proteínas fusionadas a distintos epítomos, bajo control del promotor 35S, en hojas de *Nicotiana benthamiana* y se inmunoprecipitó el complejo con anticuerpos específicos frente a uno de los tags (Liu *et al.* 2010). Este sistema aunque comporta la utilización de un modelo heterólogo, es más rápido que generar plantas estables, y se aproxima más a las condiciones fisiológicas de la planta, ya que en las células de tabaco deben expresarse las proteínas homólogas de los distintos componentes de esta vía de regulación. BIN2 se clonó en el vector pGWB14 para generar una fusión al epítipo HA en el extremo C-terminal de la proteína, mientras que PIF4 se clonó en el vector pGWB6, generando así una fusión al epítipo GFP el extremo C-terminal del factor. Las construcciones se transformaron en células de *Agrobacterium* y se co-infiltraron en hojas de *N. benthamiana*. Dos días después de la infiltración, se prepararon extractos totales de proteínas de las hojas, y éstos se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-HA conjugado a una resina de agarosa. Tras lavar bien la resina, ésta se eluyó con tampón TMx2 y la fracción recuperada se cargó en geles SDS-PAGE para su detección por western-blot. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se detectaron por incubación con anticuerpos anti-HA y anti-GFP, conjugados a peroxidasa, a fin de comprobar si la proteína PIF4-GFP estaba presente en la fracción inmunoprecipitada. Como se aprecia en la Figura 18A, se detectó una banda que correspondía a PIF4-GFP después de la inmunoprecipitación de BIN2-HA con las resina anti-HA agarosa, lo que confirma la interacción de estas proteínas en células vegetales. Esta banda no se aprecia en el control negativo que solo expresaba la proteína PIF4-GFP, y que fue igualmente inmunoprecipitada con la resina anti-HA, lo que demuestra que la banda observada no se debe a una unión inespecífica a la resina de agarosa (Figura 18A).

La interacción entre estas proteínas se confirmó también mediante ensayo de

RESULTADOS

complementación Bimolecular (BiFC). Para ello se fusionaron las proteínas a los fragmentos YFC^N y YFC^C de la proteína fluorescente YFP, en los vectores YFN43 y YFC43. Estas construcciones se transformaron en *Agrobacterium* y se co-infiltraron en hojas de *N. bethamiana*. Así, se detectó una señal YFP de fluorescencia en el núcleo de las hojas que co-expresaban ambas proteínas, pero no en los controles negativos que expresaban una de las proteínas fusionadas y su correspondiente vector vacío (Figura 18B). Con estos resultados podemos pues concluir que las proteínas PIF4 y BIN2 interaccionan en la planta.

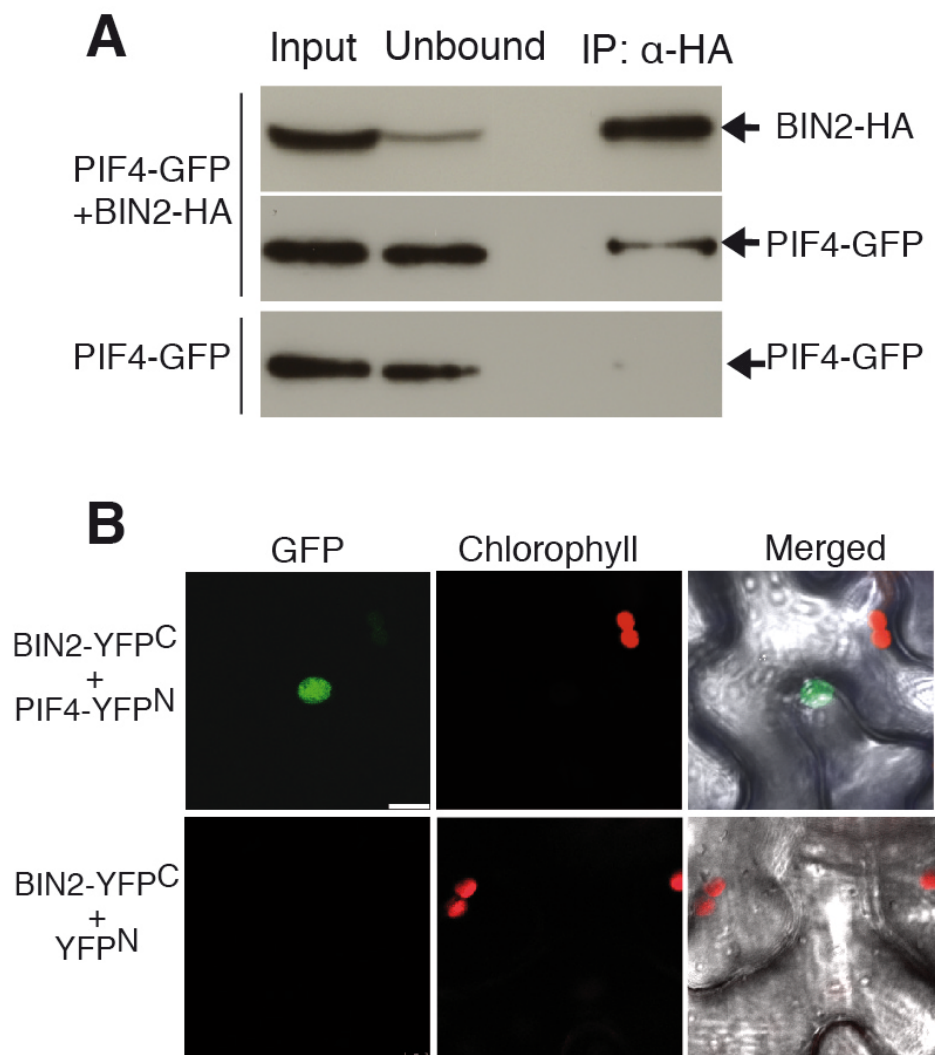


Figura 18. PIF4 interacciona con BIN2 en ensayos *in vivo* de CoIP y BiFC. (A) Después de la inmunoprecipitación de la proteína BIN2-HA con el anticuerpo anti-HA se recupera la proteína PIF4-GFP. **(B)** Se aprecia señal de fluorescencia en el núcleo en las hojas que co-expresan las construcciones BIN2-YFPC y PIF4-YFPN, pero no en las hojas control infiltradas con ambas construcciones y el vector complementario vacío de BiFC.

BIN2 fosforila a PIF4 in vitro

Una vez establecido que PIF4 interacciona *in vitro* e *in vivo* con la GSK3 quinasa BIN2, nos propusimos demostrar si PIF4 es capaz de ser fosforilado directamente por BIN2, en ensayos de fosforilación *in vitro*. Para ello, se purificaron las proteínas GST-BIN2, PIF4-6xHis y MBP-BES1 y se incubaron con un tampón quinasa en presencia de $^{32}\gamma$ -ATP. Tras 90 minutos de reacción, esta se paró añadiendo un volumen igual de tampón de carga TMx2, y las muestras se separaron en un gel de electroforesis. Como se muestra en la Figura 19A, observamos que la quinasa BIN2 es capaz de fosforilar a ambas proteínas, BES1 (se usó como control positivo) y PIF4. En ambos casos, sólo se observa el marcaje de estas proteínas cuando se añade BIN2 a la mezcla de reacción, lo que excluye que esta fosforilación se deba a otras quinasas co-purificadas con las proteínas. Cabe destacar que el marcaje observado para PIF4 es menor que el de BES1, aunque en los ensayos *pull-down* ambas proteínas parecían unirse con una afinidad similar a la quinasa BIN2 (Figura 17B). Este resultado puede atribuirse a que PIF4 muestre menos sitios de fosforilación que BES1, dado que en el caso de esta proteína se ha demostrado que BIN2 la fosforila en al menos 10 residuos Ser/Thr independientes (Ryu et al., 2007). Por otra parte, cuando se incluyó *bikinina*, un inhibidor específico de las GSK3 quinasas (De Rybel et al., 2009), en la mezcla de reacción, se observó que este inhibidor bloquea no sólo la actividad de autofosforilación de BIN2, sino también la fosforilación de la proteína PIF4. Esto confirma que el marcaje de ambas

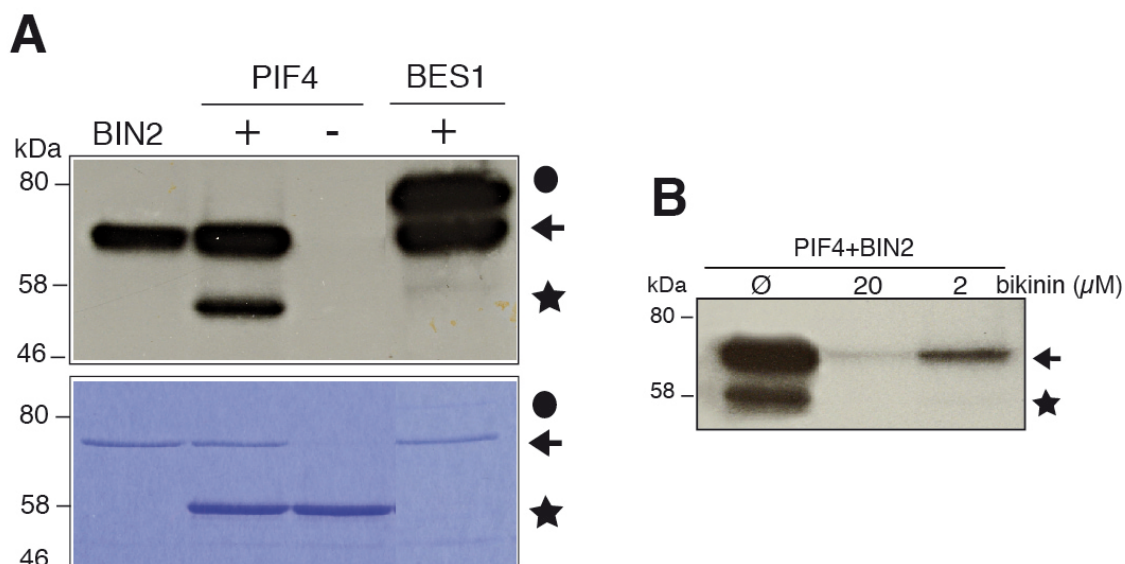


Figura 19. BIN2 fosforila a PIF4. (A) Ensayos de fosforilación *in vitro* prueban que PIF4 es fosforilado por BIN2. Como control positivo se usó la proteína BES1, un sustrato conocido de esta quinasa. (B) La inclusión de *bikinina* (20 µM y 2 µM), un inhibidor específico de la quinasa BIN2, en la mezcla de fosforilación, bloquea la actividad de autofosforilación de BIN2 y la fosforilación de PIF4.

proteínas esta mediado por la actividad quinasa de BIN2 (Figura 19B). Así, podemos concluir que PIF4 es un sustrato de fosforilación de la quinasa BIN2.

BIN2 regula la actividad transcripcional de PIF4

A fin de establecer si esta modificación afecta la actividad transcripcional de PIF4, decidimos estudiar si la aplicación de LiCl, un inhibidor específico de la quinasa BIN2, incrementaba los niveles de expresión del gen *PIL1*, que es una diana directa de PIF4. Para ello, utilizamos como líneas reportadoras, las líneas transgénicas *pPIL1::LUC* (Li et al., 2012b), en las cuales la actividad LUC se ve notablemente incrementada tras la aplicación de luz enriquecida en FR, debido a que en estas condiciones la forma activa (Pfr) de PHYB se revierte a su forma Pr inactiva, lo que provoca una fuerte estabilización de PIF4 (Hornitschek et al., 2012). Como se aprecia en las Figuras 20A y 20B, la aplicación de BRZ suprime de forma notable esta respuesta, mientras que un tratamiento adicional con BL contrarresta el efecto inhibitor del BRZ. Notablemente, el inhibidor de GSK3 quinasa LiCl (Yan et al., 2009) es también capaz de aliviar el efecto negativo del BRZ, aunque tras este tratamiento la actividad luciferasa (LUC) no es tan elevada como en las plantas tratadas con BL (Figura 20A). El efecto positivo del LiCl, no se debe a un estrés salino, ya que un tratamiento similar con NaCl, no tiene ningún efecto sobre la actividad LUC de estas plantas (Figura 20A). Además, cabe destacar que la aplicación de LiCl o *bikinina*, recupera la activación del gen *PIL1* en respuesta a GAs, en las plantas tratadas con BRZ, lo que indica que la acción represora del BRZ se revierte al inhibir la actividad GSK3 quinasa de BIN2. En efecto, los niveles de actividad LUC en plantas tratadas con BRZ+LiCl+GA, muestran ser comparable, tras 6-8 h de tratamiento, a los que se detectan en las plantas tratadas únicamente con GAs, lo que confirmaría que la quinasa BIN2 ejerce un control negativo sobre la actividad transcripcional de PIF4.

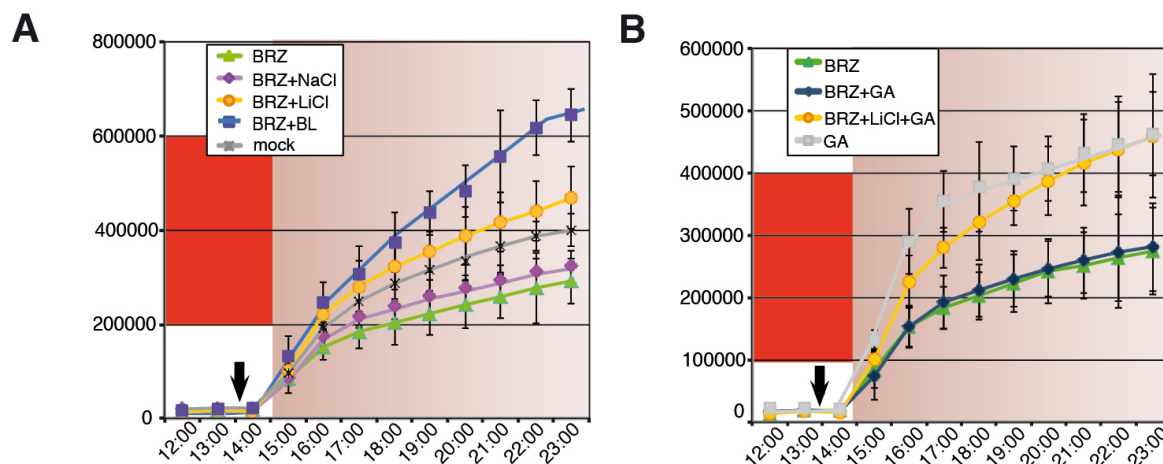


Figura 20. El inhibidor de GSK3 quinasa LiCl revierte el efecto negativo del BRZ sobre la actividad transcripcional de PIF4. (A) Los inhibidores LiCl o *bikinina*, suprimen el efecto represor de BRZ sobre la actividad transcripcional de PIF4. Para estos estudios se usaron plantas *pPIL1::LUC*, las cuales se transfirieron a los 3 días después de germinar a placas de 96 pocillos que contenían el sustrato luciferina. Las placas se mantuvieron en luz roja (R) y 1 hora antes (señalado con una flecha) de ser transferidas a luz roja lejana (FR) se añadió a los pocillos el mismo volumen de medio MS (mock) o medio MS con los distintos tratamientos: BRZ (0,5 μ M BRZ), BRZ + LiCl (0,5 μ M BRZ + 20 mM LiCl), BRZ + NaCl (0,5 μ M BRZ + 20mM NaCl) y BRZ + BL (0,5 μ M BRZ + 1 μ M BL). La aplicación de BRZ reprime la activación de *PIL1* en respuesta a FR, y esta inhibición se revierte al tratar con BRZ+BL. La aplicación de LiCl también revierte el efecto inhibitor del BRZ, pero en menor medida que la aplicación de BL. No se observa ningún efecto en los controles tratados con NaCl. **(B)** La aplicación de LiCl recupera la respuesta a GAs en plantas tratadas con BRZ. La aplicación de GAs (20 μ M) no es capaz de inducir la expresión de *PIL1* en plantas tratadas con BRZ (0,5 μ M BRZ), pero la aplicación simultánea de BRZ +LiCl + GA (0,5 μ M BRZ + 20 mM LiCl + 20 μ M GA) recupera la respuesta a GA en estas plantas. Los datos mostrados pertenecen a la media y desviación estándar (SD) de la actividad LUC de 12 plántulas.

La mutación de uno de los motivos consenso de fosforilación de BIN2 en la proteína PIF4 induce una fuerte estabilización de este factor

Las GSK3 quinasas fosforilan residuos Ser/Thr dentro de la secuencia consenso (S/T)-X-X-X-(S/T). Uno de los principales sustratos de la quinasa BIN2 son los factores BES1 y BZR1, y la caracterización de los residuos fosforilados en estas proteínas confirmó que BIN2 fosforila también residuos Ser/Thr en un motivo consenso idéntico (Ryu et al., 2010). Sin embargo, a diferencia de las GSK3-quinastas animales, BIN2 es capaz de fosforilar directamente las proteínas BES1 y BZR1 sin necesidad de una fosforilación previa por otras quinasas (Peng et al., 2010).

La proteína PIF4 de *Arabidopsis* posee más de 10 posibles sitios de fosforilación que se ajustan al motivo consenso de las GSK3 quinasas (Figura 21). Si estos sitios son importantes para modular la estabilidad de la proteína, esperaríamos que estuvieran conservados en todos los ortólogos de PIF4. Tras alinear la proteína de *Arabidopsis* con sus ortólogos de otras especies, observamos que solo dos de estos posibles sitios de fosforilación estaban conservados (Figura

RESULTADOS

21). Uno de ellos corresponde a una región rica en Ser, en tanto que el otro correspondía a una región notablemente conservada en todos los homólogos de este factor, por lo que se decidió mutar este motivo. Para la mutagénesis dirigida de este motivo, se diseñaron cebadores complementarios en los que se sustituyó los residuos Ser/Thr del motivo $\underline{T}^{160}\underline{VGPS}^{164}\underline{HCGS}^{168}$ por Ala (Figura 22A). Con estos cebadores se amplificó mediante PCR las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína incluyendo en ambos casos la región mutada. Se mezcló cantidades equimoleculares de estos productos, los cuales se desnaturalizaron, se anillaron de nuevo, y se utilizaron como molde para la amplificación de la proteína completa con nuevos cebadores sobre la región de inicio y parada. El producto de PCR obtenido se clonó en el vector TOPO S/D y se secuenció para comprobar que se había introducido la mutación deseada. De este modo se generó el clon PIF41A, con el motivo consenso mutado. Esta proteína, se fusionó a GFP por inserción mediante LR clonasa en el vector pGWB5, y se transformó en *Agrobacterium* a fin de analizar su estabilidad en hojas de *N. benthamiana*. Como se aprecia en la Figura 22B, la proteína PIF41A mostró ser mucho más estable que la proteína silvestre, dado que las hojas infiltradas con la construcción 35S::PIF41A-GFP presentaban una alta fluorescencia con una distribución en forma de agregados nucleares o “*speckles*”, a diferencia de las hojas infiltradas con la construcción 35S::PIF4-GFP que mostraron una fluorescencia mucho menor, con un patrón difuso de distribución en el núcleo. Los agregados formados por la proteína mutante, sin embargo, no se parecían a los “*speckles*” típicos formados por PIF4 en luz roja, sino que mostraron ser estables y de mucho mayor tamaño. Este patrón diferencial no se observó en las líneas transgénicas estables, por lo que consideramos que estos agregados nucleares son debidos a que los niveles de acumulación de la proteína son tan elevados que llega a ser tóxica para la célula.

Asimismo, se determinó si esta mutación era capaz de anular la fosforilación de la proteína por la quinasa BIN2. Para ello, se realizó un nuevo ensayo de fosforilación *in-vitro*, en el que se incluyó la proteína mutada PIF41A-6xHis. Como se observa en la Figura 22C, la sustitución de estos aminoácidos disminuyó la eficiencia de fosforilación, pero no anuló por completo la capacidad de BIN2 de fosforilar la proteína. Es posible que esta quinasa modifique aún a la proteína en el segundo motivo conservado, o en alguno de los otros sitios consenso de fosforilación no conservados, presentes en PIF4. Por consiguiente, decidimos generar una segunda proteína mutante en la que la Ser²⁰² se modificó a Ala, para eliminar el segundo motivo conservado. No obstante, observamos que la mutación en este segundo dominio no supone una estabilización de la proteína, lo que indica que este motivo no sería relevante para la regulación de PIF4.

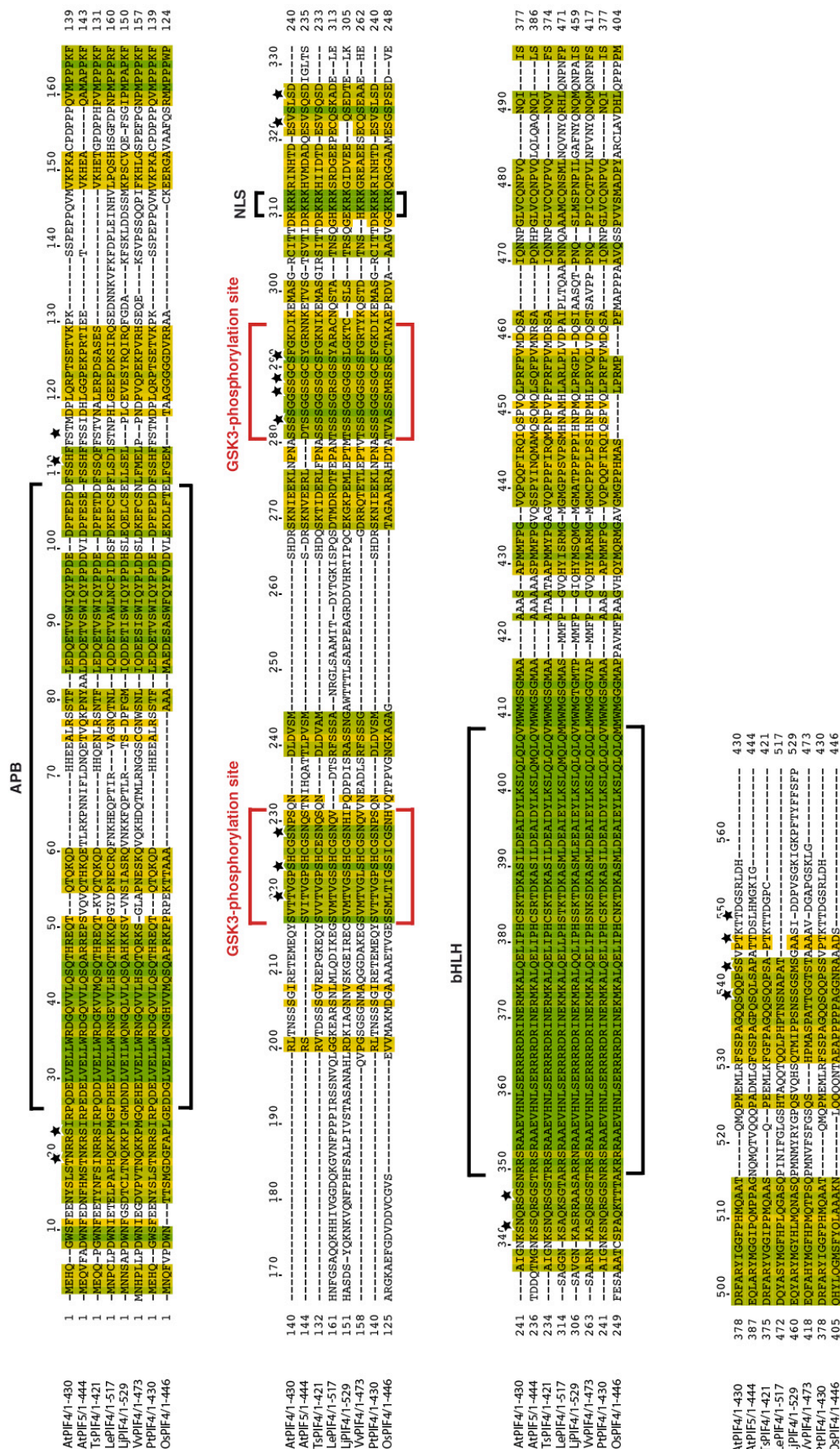


Figura 21. Alineamiento de los homólogos de PIF4 de diferentes especies vegetales donde se observa que solo dos de los posibles sitios de fosforilación de BIN2 se encuentran conservados. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas PIF4 de *Arabidopsis* (AtPIF4: AT2G430101.1) y PIF5 (AtPIF5: AT3g59060.2) con las proteínas homólogas más cercanas identificadas en *Thellungiella* (TsPIF4: Thhalv10016715m.g), tomate (LePIF4: CAO69966.1), *Lotus* (LjPIF4: ACN21633.1), uva (VvPIF4: GSVVIG01020814001), chopo (PtPIF4: POPTR_0002s05630) y arroz (OsPIF4: LOC_Os12g41650). Los sitios consenso de fosforilación de BIN2 S/T-X-X-S/T en la proteína AtPIF4 están marcados con asteriscos. En rojo están señalados los dos sitios de fosforilación que se encuentran conservados en todas estas proteínas.

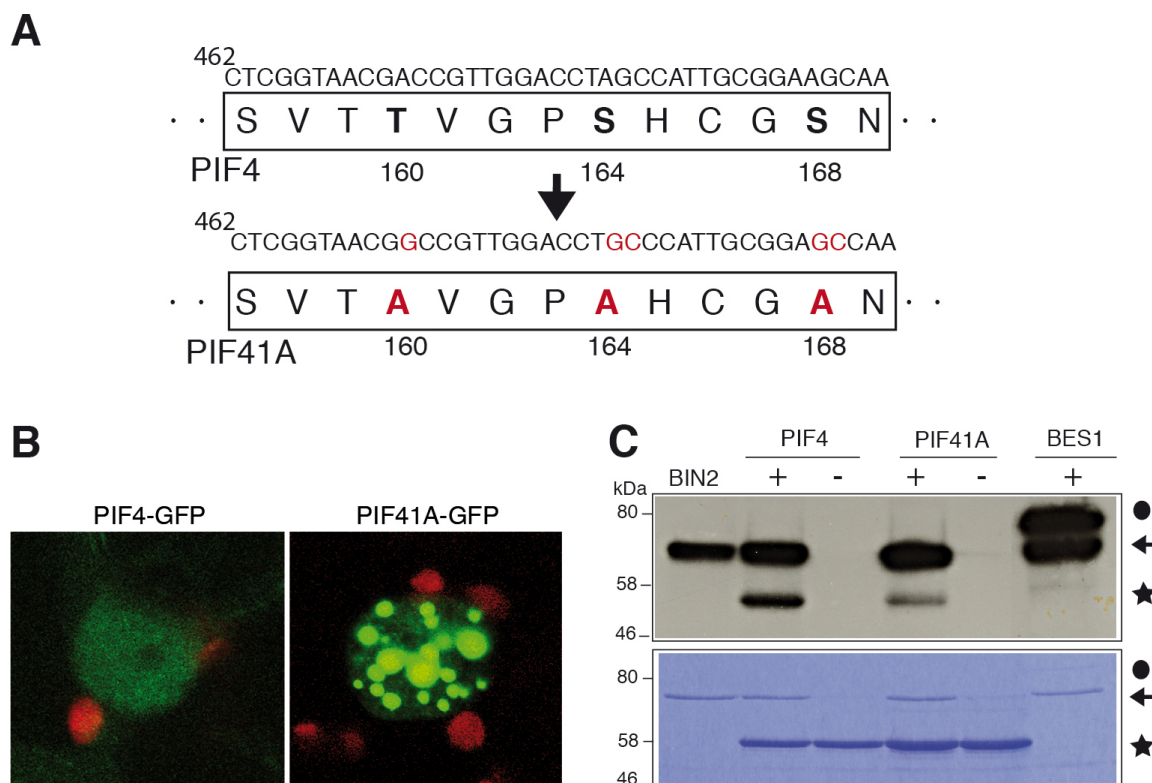


Figura 22. La mutación de una de las diana consenso de BIN2, reduce la eficiencia de fosforilación de la proteína PIF41A y conduce a una notable estabilización de esta proteína. (A) Esquema representativo del primer sitio conservado de fosforilación en la proteína PIF4. En rojo se muestran las mutaciones puntuales generadas para convertir las serinas (S) o treoninas (T) en alaninas (A). **(B)** La proteína PIF4-GFP y la proteína mutada PIF41A-GFP se agroinfiltraron en hojas de *N. benthamiana*. Las hojas que expresan la proteína PIF41A presentan una alta fluorescencia con distribución en cuerpos nucleares, a diferencia de las hojas que expresan la proteína PIF4 que muestran un patrón nuclear difuso. **(C)** Ensayo de fosforilación con la proteína mutada PIF41A. La sustitución de los residuos Ser/Thr por Ala, disminuye la eficiencia de fosforilación por la quinasa BIN2, pero no elimina totalmente la fosforilación de PIF41A. La proteína BES1 se incluyó como control positivo de fosforilación.

En base a estos resultados, decidimos generar líneas estables de *Arabidopsis* que expresaran la construcción 35S::PIF41A-GFP, con el objetivo de analizar si esta mutación comportaba una diferente regulación de la proteína y generaba un fenotipo característico en la planta. Como se aprecia en la Figura 24A, las líneas que sobre-expresan la proteína PIF41A muestran en efecto una elongación excesiva del tallo y los peciolo, y florecen de forma extremadamente temprana, lo que es indicativo de una mayor activación del factor PIF4 en estas plantas que en las plantas que sobre-expresan la proteína silvestre. De las líneas generadas se seleccionaron aquellas que expresaban niveles similares de transcrito que las líneas 35S::PIF4-GFP para, de esta forma, excluir que el distinto fenotipo o niveles de acumulación de la proteína en estas plantas fueran debidas a diferencias en los niveles de expresión del transgén (Figura 24C). La observación de las raíces de las plantas PIF4 y PIF41A al microscopio confocal mostró

RESULTADOS

que la fluorescencia nuclear de PIF41A-GFP era mayor que la de la proteína PIF4-GFP, lo que indicaba que la proteína mutante era más estable. Sin embargo, a diferencia de lo que habíamos observado en hojas de *benthamiana*, la proteína PIF41A-GFP parecía mostrar un patrón de acumulación en el núcleo similar al de la proteína PIF4-GFP. Ambas proteínas muestran una expresión nuclear difusa y forman agregados nucleares o “*speckles*” similares cuando son irradiadas con luz roja (R) (Bauer et al., 2004; Leivar et al., 2008). Estos agregados desaparecen tras un pulso de luz roja lejana (FR), además, vimos que la aplicación de BL no alteraba la localización sub-celular de ninguna de las dos proteínas (Figura 23).

Se analizaron los niveles de acumulación de ambas proteínas por western blot, y confirmamos así que la proteína PIF41A se acumula a niveles mucho mayores en luz (Figura 24D). Sin embargo, en oscuridad las diferencias no son tan grandes, debido a que en estas condiciones la proteína silvestre se estabiliza.

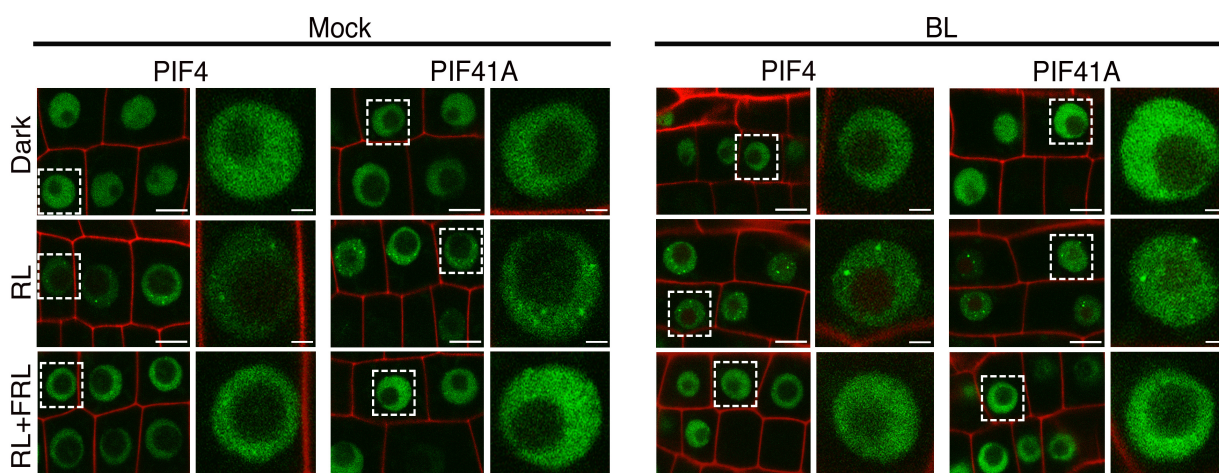


Figura 23. Las proteínas PIF4 y PIF41A muestran una similar localización subcelular en respuesta a luz roja (R) y roja lejana (FR) y su patrón no cambia en respuesta a BL. Las plantas PIF4-GFP y PIF41A-GFP se crecieron en condiciones de oscuridad (dark) y luz roja (RL), y 24 horas antes de observar su patrón de fluorescencia por microscopía confocal, se transfirió algunas plántulas a medio MS con BL (1 μ M BL). Además, a algunas de las plántulas crecidas en RL se les dio un pulso de 15 min de luz roja lejana (FR) para comprobar que los agregados nucleares o “*speckles*” formados en RL desaparecían tras un pulso de FR (RL + FRL). Las barras de escala en los paneles de células con varios núcleos representan 6 μ m y 1,5 μ m en los paneles con un sólo núcleo.

Cuando en estas plantas se analizó los niveles de expresión del gen *PIL1*, que corresponde a una diana directa del factor PIF4, observamos que la expresión de este gen estaba activada tanto en las líneas PIF4-GFP como las líneas PIF41A-GFP, aunque los niveles de expresión eran más elevados en las líneas PIF41A (Figura 24E). Además, se observó que la aplicación de BL

RESULTADOS

activa la expresión de *PIL1* a unos niveles superiores en las plantas PIF4-GFP que en Col-0, y que esta activación era aún mayor en las plantas PIF41A-GFP, donde llega a ser el doble que el observado en las condiciones *mock* o control (Figura 24E). Por otra parte, la aplicación del inhibidor BRZ, suprime la expresión de este gen tanto en las líneas PIF4, como en Col-0, y en una medida mucho menor en las líneas PIF41A (Figura 24E). Por lo tanto, estos resultados indicarían que la mutación de los residuos T¹⁶⁰, S¹⁶⁴ y S¹⁶⁸ confiere una resistencia parcial a BRZ, al estabilizar la proteína PIF41A, independientemente de la activación (+ BRZ) o inactivación (+ BL) de la quinasa BIN2.

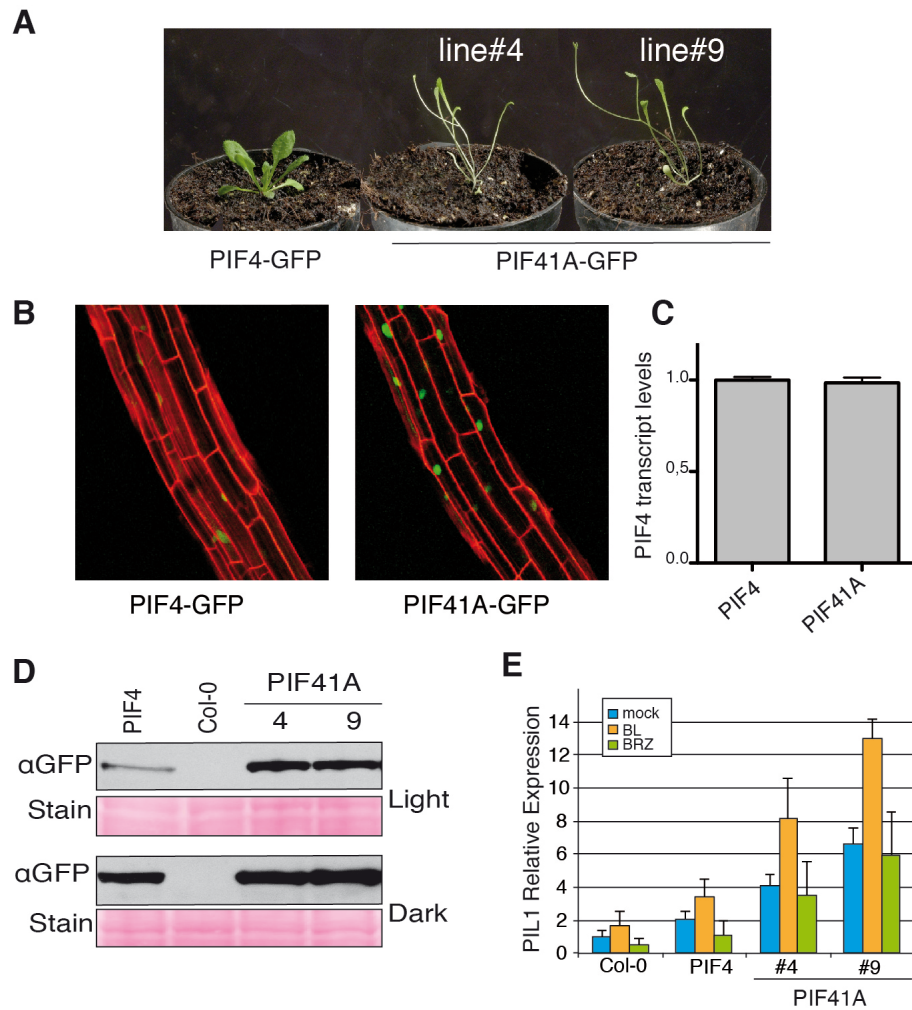


Figura 24. La sobre-expresión de la proteína PIF41A provoca un fenotipo alargado severo y la activación de la expresión de *PIL1* aún en presencia de BRZ. (A) La sobre-expresión de la proteína mutada PIF41A causa una elongación exagerada de los peciolo y del tallo y un fenotipo extremo de floración temprana. Para este experimento las plantas se crecieron durante 3 semanas. **(B)** Patrón de fluorescencia de plantas que expresan las proteínas PIF4-GFP y PIF41A-GFP. En raíces de 5 días la fluorescencia de PIF41A-GFP es mayor que la de la proteína PIF4-GFP, lo que indica una mayor estabilidad de la proteína no fosforilable. Ambas proteínas se localizan en el núcleo. **(C)** El diagrama de barras muestra la cuantificación de los niveles de PIF4 mRNA en las líneas PIF4-GFP y PIF41A-GFP. Se analizó los niveles de expresión del transgén para verificar que eran equivalentes. **(D)** Detección mediante western blot de las proteínas PIF4-GFP y PIF41A-GFP. Se observan niveles mayores de la proteína PIF41A en las plantas crecidas en luz, lo que sugiere que la fosforilación por BIN2 contribuye a la desestabilización del factor PIF4 en luz. En oscuridad, PIF4 es más estable y las diferencias entre los niveles de las proteínas PIF4 y PIF41A son mucho menores. **(E)** Análisis mediante qPCR de los niveles de expresión de *PIL1* en Col-0 y en las líneas que sobre-expresan las proteínas PIF4 y PIF41A. La expresión de *PIL1* es más elevada en las líneas que sobre-expresan las proteínas PIF4 y PIF41A. La aplicación de BL aumenta considerablemente la expresión de este gen, y este efecto es más evidente en la línea PIF41A. En estas líneas, la aplicación de BRZ tiene un efecto inhibitor menor sobre la expresión del gen diana *PIL1*, por lo que muestran una resistencia parcial a BRZ. Los resultados mostrados representan el promedio de dos réplicas biológicas.

La expresión de PIF41A suprime parcialmente el fenotipo enano de los mutantes *bin2-1*

Para estudiar más en profundidad si la mutación PIF41A confiere una activación constitutiva del factor PIF4, decidimos analizar si la sobre-expresión de esta proteína, suprime el fenotipo enano de los mutantes *bin2-1*. Estos mutantes son insensibles a BL debido a que la quinasa BIN2 está constitutivamente activa (Peng et al., 2008). Para ello, se cruzaron las líneas 35S::PIF41A-GFP con el mutante *bin2-1*, y en la F2 se genotiparon los distintos individuos segregantes, a fin de determinar si correspondían a plantas homocigotas o heterocigotas para la mutación *bin2-1* (esta mutación es semidominante). Como se muestra en la Figura 25A, la expresión de PIF41A mostró ser capaz de compensar el fenotipo semi-enano del mutante heterocigoto *bin2-1* (+/-), pero no suprimió el fenotipo más severo de las plantas homocigotas. Las plantas PIF41A*bin2-1* son algo más altas que *bin2-1* (Figura 25), pero aún mantienen el fenotipo enano y las hojas curvadas características de estos mutantes.

Este efecto de complementación parcial parecía sugerir que PIF4 necesita de la función de algún otro factor regulado por BRs, para la activación de sus genes diana. Efectivamente, en un trabajo publicado mientras llevábamos a cabo estos estudios se reportó que BZR1 se une al factor PIF4 y actúa como co-activador de este factor (Oh et al., 2012). En este trabajo se demostraba que ambos factores se unen como un único complejo a elementos G-box conservados en los promotores de los genes co-regulados por PIF4 y BES1/BZR1 (estos genes están activados en las líneas *PIF4OX* y *bzr1-1D*). Este grupo de genes está particularmente enriquecido en genes implicados en la remodelación de la pared celular y en la síntesis y señalización de auxinas, los cuales actúan como efectores del proceso de elongación celular (Oh et al., 2012). Además, los factores PIFs son necesarios para que BZR1 pueda promover una elongación del hipocotilo, ya que una pérdida de función en los genes *PIF1*, *PIF3*, *PIF4* y *PIF5*, en el mutante *pifq*, suprime el fenotipo alargado de los mutantes *bzr1-1D*, con una respuesta constitutiva a BRs. Por otra parte, estos autores reportaban que la mutación *bzr1-1D* suprime el fenotipo enano del mutante *bri1-116* en oscuridad, pero no en la luz, y que las plántulas *PIF4OX bzr1-1D bri1-116* crecidas en luz eran más pequeñas que las líneas *PIF4OX*; lo que apoyaba nuestros resultados relativos a una función adicional de la quinasa BIN2 en la fosforilación de PIF4 y en la regulación de la estabilidad de este factor en la luz.

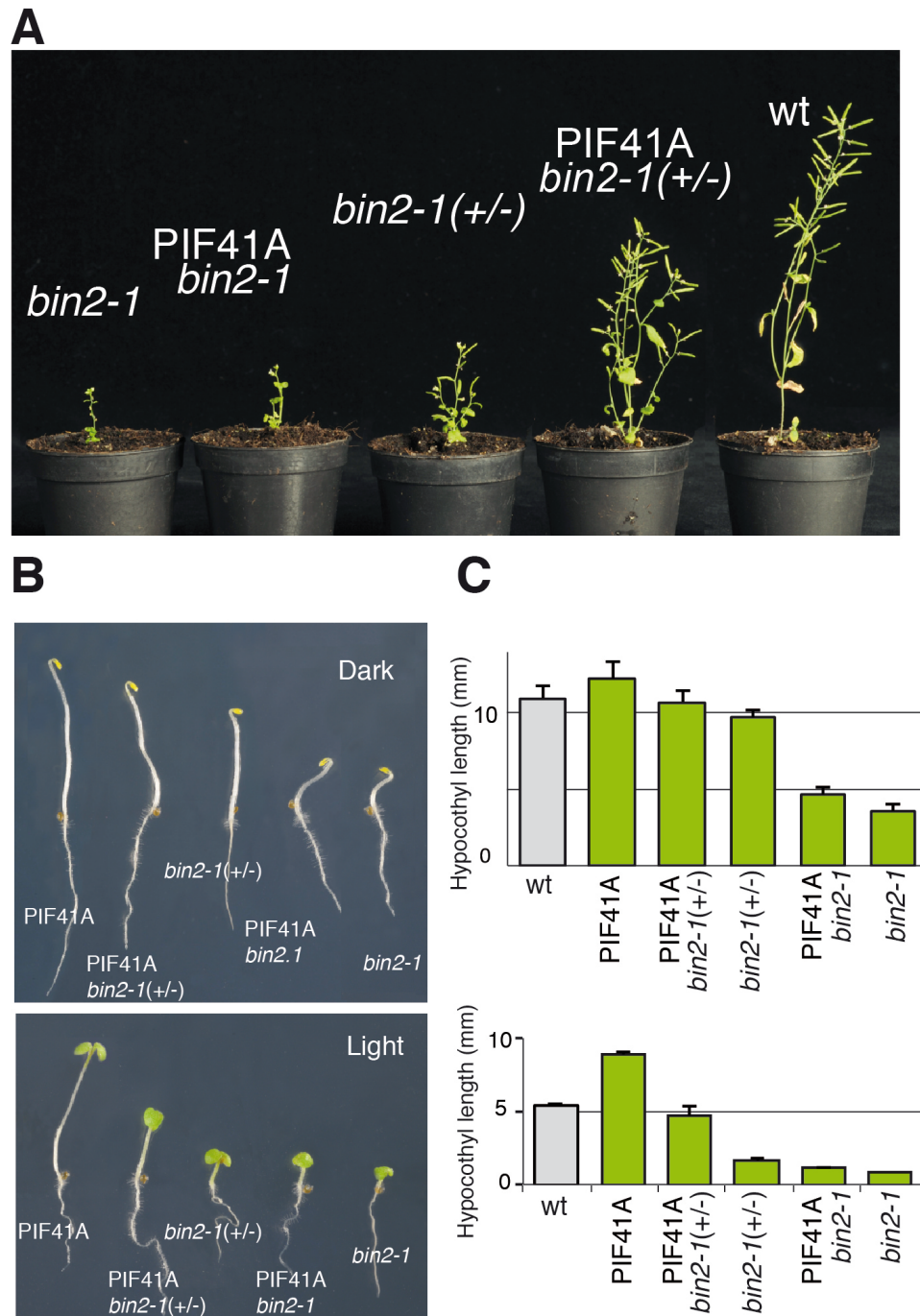


Figura 25. La sobre-expresión de la proteína PIF41A suprime el fenotipo enano de las líneas *bin2-1* heterocigóticas pero no el del mutante homocigoto. (A) Fenotipo de las plantas que sobre-expresan la proteína PIF41A-GFP en el fondo *bin2-1*. La sobre-expresión de la proteína PIF41A recupera el crecimiento y la fertilidad de las plantas mutantes *bin2-1* (+/-), pero no es capaz recuperar el fenotipo, más severo, del mutante homocigoto *bin2-1*. Las plantas se crecieron en el invernadero durante 4 semanas. **(B) y (C)** Fenotipo de las plántulas germinadas en luz o en oscuridad. Los gráficos muestran las medidas de la longitud de los hipocótilos. Las plantas se crecieron durante 5 días en medio MS en condiciones de oscuridad (gráfico superior) o en condiciones de luz (gráfico inferior). Los datos representan los promedios obtenidos de un total de 10 plantas y las barras de error la \pm SEM.

La fosforilación de BIN2 ejerce un papel fundamental en la desestabilización de la proteína PIF4 al amanecer

El crecimiento de las plantas muestra un patrón cíclico, que en días cortos, se caracteriza por una rápida elongación del hipocotilo al amanecer y se alterna con un intervalo de crecimiento mínimo durante el día y principio de la noche (Nozue and Maloof, 2006). Por esta razón, decidimos comprobar en qué momento del día PIF4 era más estable, y de que modo la fosforilación por BIN2 afectaba la estabilidad de la proteína y modulaba el patrón cíclico de elongación del hipocotilo. Para ello, se generaron líneas transgénicas *pif4pif5* que expresaban la proteína PIF4-HA y la proteína mutante PIF41A-HA bajo el control de su propio promotor (Figura 26A). Se seleccionaron las líneas cuyo nivel de expresión del transgén era similar a los niveles de transcripción de *PIF4* en plantas silvestres, y se verificó que los patrones de acumulación de estos mensajeros a lo largo del día coincidían con el patrón descrito para el gen endógeno *PIF4* (Figura 26B), lo que aseguraba que estas líneas no mostraban un perfil alterado de expresión debido al sitio de inserción.

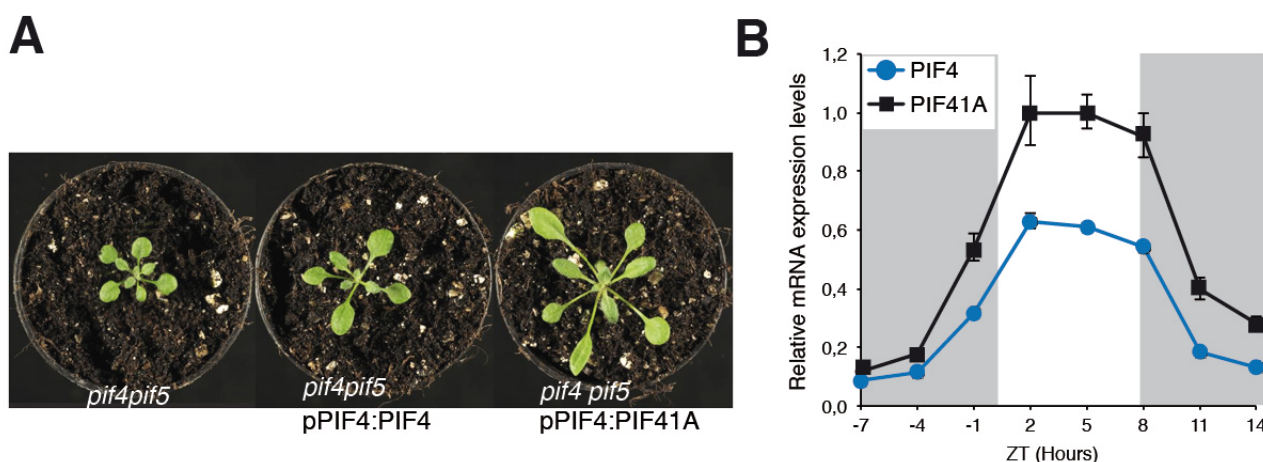


Figura 26. Fenotipo de las líneas *pif4pif5* y de las líneas transgénicas *pif4pif5* que expresan la proteína silvestre PIF4-HA y la proteína mutante PIF41A-HA bajo el control de su propio promotor. (A) La línea PIF41A-HA presenta peciolo alargados y hojas estrechas, características de plantas crecidas en la sombra. **(B)** El análisis de expresión de *PIF4* en las líneas transgénicas *pif4pif5* PIF4-HA y *pif4pif5* PIF41A-HA muestra que los niveles del transcrito son similares y que los patrones de acumulación diurna concuerdan con lo descrito para el gen *PIF4* endógeno (Nozue et al., 2007). Las muestras se recogieron cada dos horas a lo largo de un ciclo de día corto de 24 horas.

Las líneas *pPIF4::PIF4*-HA, en efecto recuperaron el fenotipo enano de hojas redondeadas del mutante *pif4pif5*, y mostraron un patrón idéntico de crecimiento que las plantas *col-0*. Las plantas *pPIF4::PIF41A*-HA, en cambio, mostraban hipocotilos más largos, peciolo alargados y

RESULTADOS

hojas estrechas características de plantas crecidas en la sombra (Figura 26A). Se comprobó también que las líneas *pPIF4::PIF4*-HA mostraba una respuesta de elongación similar a la de las plantas silvestres a elevadas temperaturas. Para ello las plantas se crecieron a 22°C y 28°C y se midió la longitud de los hipocotilos tras varios días de cultivo en estas condiciones. Como se aprecia en las Figuras 27A y 27B, estas plantas respondieron al cambio de temperatura con un incremento similar en la longitud del hipocotilo al observado en Col-0 a 28°C. Por otra parte, respondieron también igual a los tratamientos con PAC (Figura 31D) y BRZ (Figura 31A y Figura 31B), lo que demostraba que estas líneas constituyen una excelente herramienta para el estudio de cambios en la estabilidad del factor PIF4 en respuesta a diferentes condiciones ambientales, gracias al epítipo HA. Las plantas PIF41A-HA, en cambio, mostraron una mayor respuesta de elongación a 28°C (Figura 27A) y se caracterizaron por presentar una respuesta hiposensible a los inhibidores PAC y BRZ (Figura 31A), lo cual concordaba con el fenotipo esperado, ya que habíamos observado que la mutación PIF41A resulta en una mayor estabilidad de la proteína.

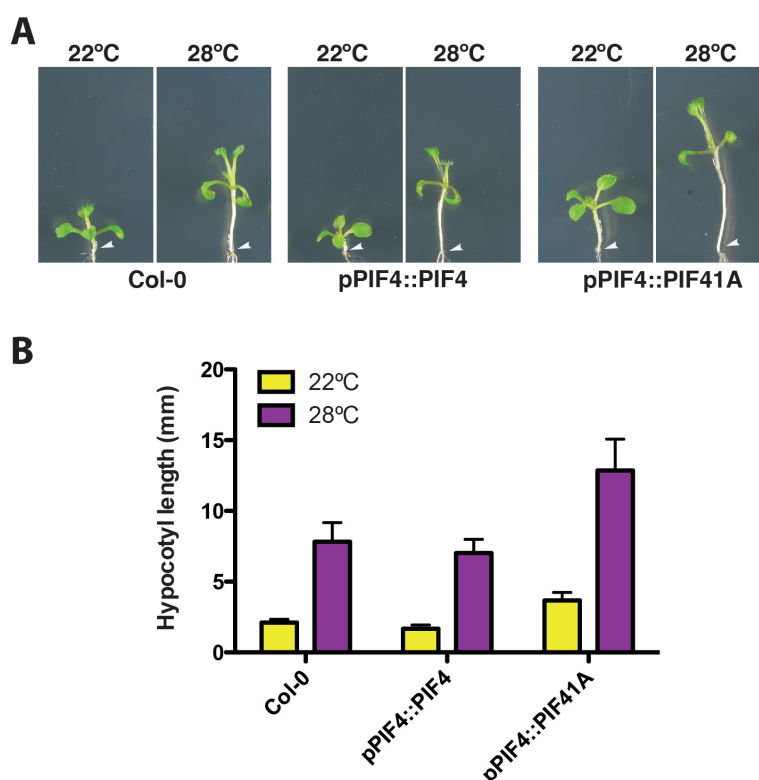


Figura 27. Las construcciones *pPIF4::PIF4*-HA y *pPIF4::PIF41A*-HA son totalmente funcionales. (A) Para comprobar que la construcción *pPIF4::PIF4*-HA reproduce fielmente el patrón de regulación del factor PIF4 endógeno, las plantas se crecieron a 22°C y a 28°C. Las plantas *pPIF4::PIF4*-HA mostraron a 28°C una similar elongación del hipocotilo que las plantas silvestres Col-0. En las líneas *pPIF4::PIF41A*-HA se observa una respuesta exagerada, lo que estaría de acuerdo con una mayor estabilidad la proteína mutante (B) Medida de la longitud de los hipocotilos de las plantas que se muestran en el apartado (A). Las flechas indican el inicio del hipocotilo.

RESULTADOS

Dado que los estudios anteriores mostraban que la región promotora *pPIF4* que habíamos utilizado para generar estas construcciones reproduce fielmente el patrón de activación del gen endógeno (las líneas PIF4-HA mostraron un fenotipo idéntico al de Col-0 en todas las condiciones ensayadas), decidimos llevar a cabo estudios western blot para analizar el perfil de acumulación de las proteínas PIF4-HA y PIF41A-HA a lo largo de 24 h. Sorprendentemente, aunque está ampliamente aceptado que PIF4 se degrada en la luz y que por tanto la proteína se acumula únicamente al final de la noche (Nozue et al., 2007), en estos estudios observamos que ambas proteínas se acumulaban a niveles significativos durante el día (Figura 28A y 28C), para luego caer rápidamente después del anochecer, donde la transcripción de *PIF4* se reprime (Nusinow et al., 2011). Este resultado es de gran relevancia, ya que aporta una visión totalmente distinta a como se regulan los PIFs a lo largo del día. Cabe destacar que en un estudio reciente, en el que se utilizó líneas *pPIF4::PIF4-citrina-HA* para estudiar la estabilidad de este factor en respuesta a elevadas temperaturas, se observó también que PIF4 se acumula a niveles relativamente altos durante el día (Yamashino et al., 2013). Estas líneas, sin embargo, mostraban un fenotipo alargado, por lo que los autores no pudieron descartar que la estabilización de PIF4 en la luz, no fuera debida a la adición de citrina al extremo C-terminal de la proteína. Las líneas PIF4-HA generadas en este trabajo, sin embargo, muestran un fenotipo idéntico a Col-0, aunque también observamos un perfil similar de acumulación durante el día. Además, en estudios en paralelo utilizando líneas *35S::PIF4-HA*, que expresan la misma fusión bajo control del promotor 35S (Figura 28E), pudimos observar una acumulación preferencial de la proteína durante la noche, tal y como se había reportado en otros trabajos (Nozue et al., 2007). En su conjunto, estos resultados demuestran que PIF4 es en efecto más estable durante la noche, pero los elevados niveles de transcripción del promotor *PIF4* en el día hacen que la proteína sea aun capaz de acumularse a niveles relativamente altos en presencia de luz. Durante el día, este factor estaría mayoritariamente reprimido por los represores DELLA, que se acumulan preferentemente en luz (Achard et al., 2007). A su vez, se ha reportado que PHYB impide la unión de los PIFs a los promotores de sus genes diana, lo que contribuiría a inhibir la actividad transcripcional de estos factores en el día (Park et al., 2012).

Por otra parte, observamos que al igual que habíamos visto en las líneas *35S::PIF41A-GFP*, la proteína PIF1A-HA se acumula a niveles más altos que la proteína PIF4-HA, y que la diferencia entre los niveles de acumulación de ambas proteínas es mayor al final de la noche. Además, PIF41A migra en esta fase del día como una banda de mayor movilidad, que corresponde a la forma no fosforilada de la proteína (Figura 28A, 28B y Figura 14). Durante las horas de luz, se observa la aparición de isoformas de menor movilidad en ambas proteínas (Figura 28A y 28B), las cuales corresponden a las distintas formas de fosforilación mediada por PHYB (Ni et al., 2013).

RESULTADOS

Así, estos resultados demostrarían que BIN2 ejerce un papel importante en la regulación de la estabilidad de PIF4 al amanecer, y que en esta fase del día la ruta de señalización de BRs posiblemente contribuye a inactivar a BIN2 y estabilizar a PIF4, antes de que la luz active a PHYB y el complejo formado con las DELLAs bloquee la actividad transcripcional de PIF4.

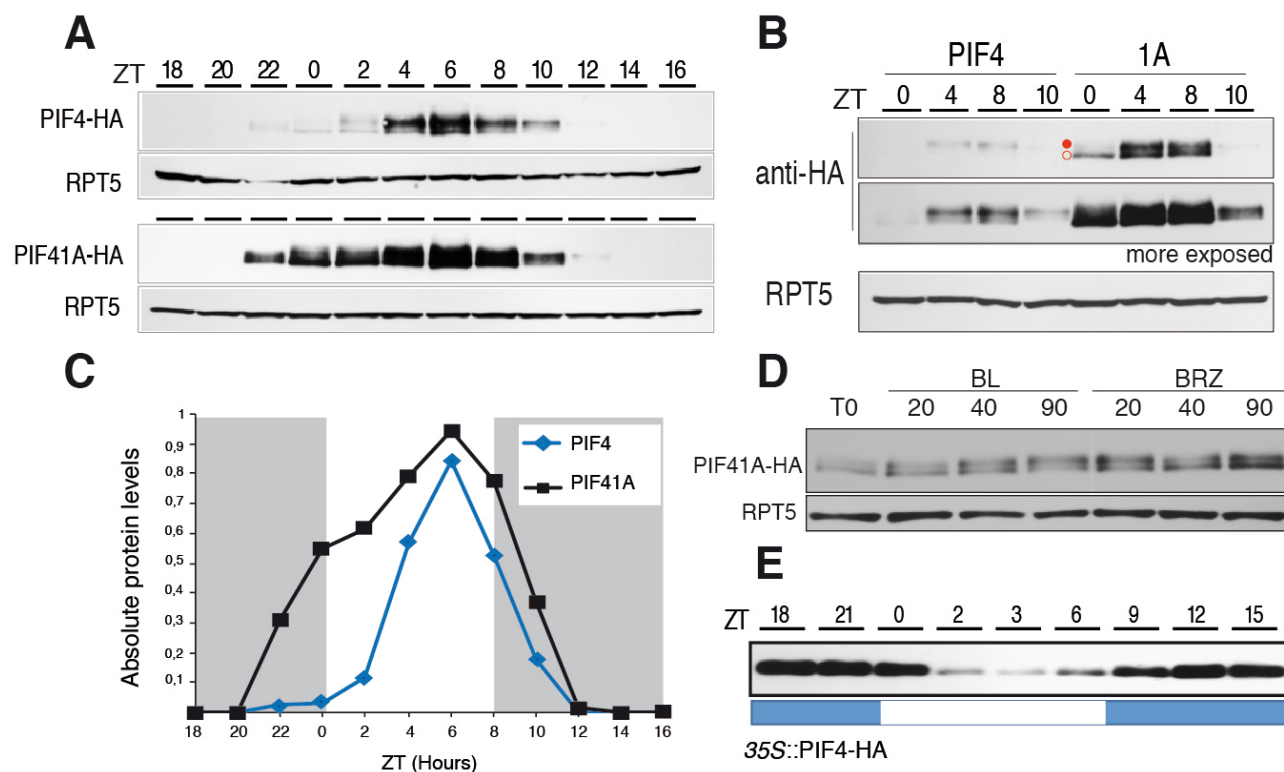


Figura 28. BIN2 modula la estabilidad de PIF4 al amanecer. (A) y (B) Niveles de acumulación de la proteína PIF4-HA y PIF41A-HA. Las plantas se crecieron en día corto durante 6 días y las muestras se tomaron cada 2 horas durante un ciclo de 24 horas. Los niveles de ambas proteínas se analizaron mediante western blot usando un anticuerpo anti-HA. Ambas proteínas se acumulan durante el día y caen rápidamente después del anochecer. La proteína PIF41A es mucho más estable que la proteína PIF4. Se usó un anticuerpo contra RPT5 como control de carga. (C) Cuantificación del western blot mostrado en (A). Las intensidades de las bandas se cuantificaron mediante el programa ImageJ. La proteína PIF41A se acumula mucho más que PIF4, especialmente al final de la noche (ZT22) y al principio del día (ZT0-ZT2). (D) Las plantas PIF41A-HA se trataron con 1 μ M BL (BL) y 2 μ M BRZ para analizar la estabilidad de esta proteína mutante. Los números indican el tiempo del tratamiento en minutos. Los niveles de PIF41A son similares en ambos tratamientos. (E) Niveles de acumulación de la proteína PIF4 en las líneas 35S::PIF4-HA. Las plantas se crecieron como antes en día corto durante 6 días. La proteína PIF4 se acumula mayoritariamente en oscuridad, según lo descrito anteriormente (Nozue et al., 2007).

Para obtener una estimación de la estabilidad relativa de estas dos proteínas, se analizó su vida media tras inhibir la síntesis *de novo* de proteína con cicloheximida (CHX). Para ello se utilizaron plantas que habían sido tratadas con o sin BL (Figura 29A). Observamos que mientras que PIF4 se desestabiliza tras 30 minutos de la aplicación de CHX, PIF41A sigue detectándose a los 90 minutos, lo que evidencia que en efecto PIF41A es mucho más estable. Además, vimos que

RESULTADOS

la aplicación de BL incrementa la estabilidad de PIF4, cuya vida media en BL se asemeja a la de PIF41A, mientras que la aplicación de BL no afecta la vida media de PIF41A, que mostraría en términos de estabilidad una respuesta constitutiva a BRs (Figura 29A).

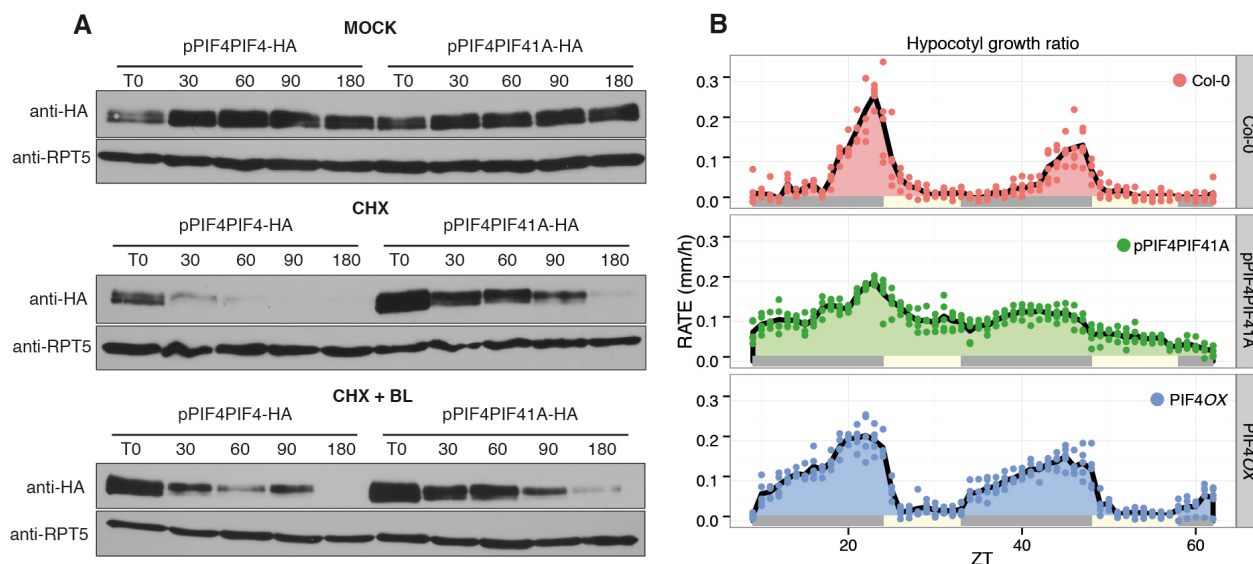


Figura 29. La mutación PIF41A da lugar a una estabilización constitutiva de la proteína y promueve el crecimiento continuo del hipocotilo. (A) Análisis de la vida media de las proteínas PIF4 y PIF41A. Las plantas se crecieron en condiciones de día corto durante 7 días y se incubaron durante 12 horas en medio MS líquido con 0,5 μM BRZ. Tres horas antes de encenderse la luz las plantas se transfirieron a nuevo medio con 0,5 μM BRZ (mock) o 1 μM BL (BL), y una hora después se añadió la CHX (50 μM CHX). Las plántulas se dejaron en oscuridad, y se recogieron muestras (10 plántulas por punto) a distintos tiempos según se indica (30, 60, 90 y 180 minutos). Los niveles de las proteínas PIF4 y PIF41A en estas muestras se analizaron por western blot y se detectaron con un anticuerpo anti-HA. La proteína PIF4 se desestabiliza tras 30 min de la aplicación de CHX, mientras que la proteína PIF41A se observa aún después de 90 minutos. El tratamiento con BL aumenta la vida media de PIF4 a niveles similares a los de la proteína PIF41A, pero no afecta la estabilidad de la proteína mutante. **(B)** Patrones de crecimiento diurno de las plantas Col-0, PIF41A y PIF4OX. Las plantas se crecieron en condiciones de día corto y se tomaron imágenes cada hora a lo largo de dos días. Se midió la longitud de los hipocotilos de 5 plantas para cada genotipo, y en el gráfico se representa la tasa de crecimiento en función del tiempo. El crecimiento de Col-0 es máximo al amanecer, en tanto que las plantas 35S::PIF4-HA (PIF4OX) crecen durante toda la noche, de acuerdo con lo descrito previamente (Nozue et al., 2007). Las plantas *pPIF4::PIF41A*-HA muestran un crecimiento continuo, lo que demuestra que la fosforilación por BIN2 juega un importante papel en establecer la fase de crecimiento del hipocotilo al amanecer. Los periodos de luz y oscuridad se representan con barras blancas y grises.

Por último, a fin de demostrar que BIN2 es la GSK3 quinasa responsable de modificar el sitio consenso mutado en la proteína PIF41A, se cruzaron las líneas *pPIF4::PIF4*-HA y *pPIF4::PIF41A*-HA con el mutante *bin2-1*, con una respuesta insensible a BRs debido a la activación constitutiva de esta quinasa. Las líneas parentales PIF4, PIF41A y las semillas obtenidas del cruce se sembraron en medio MS y se crecieron en condiciones de día corto. A los 7 días se trataron con CHX, y se recogieron después de 30 minutos, ya que habíamos visto que a

RESULTADOS

este tiempo apreciábamos diferencias claras en la vida media de ambas proteínas. Como se observa en la Figura 30, las plantas PIF4 *bin2.1* mostraron niveles mucho menores de acumulación de la proteína PIF4 que la línea parental, mientras que en las plantas PIF41A *bin2.1* los niveles de esta proteína eran prácticamente idénticos a los de la línea PIF41A. Además, la aplicación de CHX hace que, en el fondo *bin2.1*, PIF4 se degrade rápidamente mientras que la proteína PIF41A se mantiene igual de estable que en el fondo silvestre, lo que demuestra que una hiperactivación de BIN2 conduce a la desestabilización de PIF4, pero no afecta la estabilidad de la proteína PIF41A. Por consiguiente, este resultado demostraría que PIF4 es una diana directa de fosforilación de BIN2, y que la mutación que habíamos introducido en el motivo consenso GSK3 quinasa, previene que BIN2 modifique y desestabilice esta proteína.

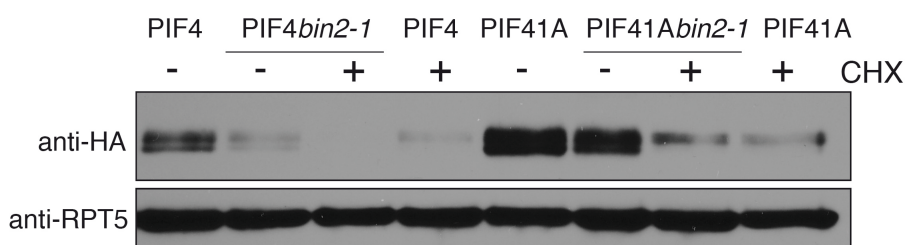


Figura 30. BIN2 fosforila a PIF4 *in vivo*. Las plantas *pPIF4::PIF4-HA* y *pPIF4::PIF41A-HA* en fondo *pif4pif5* se cruzaron con el mutante *bin2-1*, que acumula la quinasa BIN2 de forma constitutiva. Las plantas se crecieron durante 7 días en placas verticales en condiciones de día corto y 12 horas antes del experimento se transfirieron a medio MS líquido con 0,5 μ M BRZ. Media hora antes de que se encendiera la luz las plántulas se pasaron a nuevo medio MS líquido con 0,5 μ M BRZ (mock) ó BRZ + CHX (50 μ M CHX) y las muestras se recogieron a los 30 minutos del tratamiento. La proteína PIF41A mostró ser igual de estable en el fondo silvestre que *bin2.1*, en tanto que la proteína PIF4 se acumula a niveles mucho más reducidos en el fondo mutante. El tratamiento con CHX resulta también en una desaparición más rápida de la proteína PIF4 en el fondo *bin2.1*, mientras que PIF41A mostró una vida media similar en ambos fondos. Ello demostraría que PIF4 es fosforilado directamente por BIN2 *in vivo* y que la mutación 1A previene que la proteína sea fosforilada por esta quinasa.

Se analizó si la mutación en el sitio consenso de fosforilación afectaba al patrón de crecimiento de las plantas. Para ello, se midió la longitud de los hipocotilos de las plántulas Col-0, PIF41A y PIF4OX durante dos días (Figura 29B). En condiciones de día corto, el crecimiento de Col-0 fue máximo al amanecer, mientras que las plantas PIF4OX muestran un crecimiento mayor en la noche, como se ha descrito anteriormente (Nozue et al., 2007). Curiosamente, las plantas PIF41A muestran un crecimiento continuado, con tasas de crecimiento muy similares a lo largo de la noche y del día (Figura 29B). Este patrón de crecimiento concuerda con que la fosforilación dependiente de BL del factor PIF4 ejerza una función preponderante en establecer la fase del día en que la elongación del hipocotilo es máxima.

Las plantas PIF41A*bes1-d* son insensibles a BRZ en luz

Los mutantes de ganancia de función *bes1-D* y *bzr1-1D* causan una activación constitutiva de los factores de transcripción BES1 y BZR1. Ello se debe a las mutaciones que estos mutantes comparten en el dominio PEST, las cuales incrementan la afinidad de unión a la proteína PP2A, encargada de de-fosforilar y activar estos factores (Tang et al., 2011). Los mutantes *bes1-D* y *bzr1-1D* son insensibles a BRZ en oscuridad, pero presentan fenotipos opuestos en luz, a pesar de que comparten un 88% de identidad y regulan un conjunto idéntico de genes. Se ha descrito que el mutante *bzr1-1D* muestra un leve fenotipo enano y una respuesta hipersensible a BRZ en luz, mientras que las plantas *bes1-D* crecidas en luz serían insensibles a BRZ. El fenotipo opuesto en la luz de estos dos mutantes, sigue aún sin entenderse ya que la luz no afecta de manera significativa los niveles de estas proteínas (Luo et al., 2010). Estudios recientes indican también que ambos factores se unen a los promotores de los mismos genes (Yu et al., 2011). En un trabajo reciente se ha establecido que BZR1 se une a PIF4 y funciona como un co-activador de este factor (Oh et al., 2012), y se propone que esta función es también común a BES1. Puesto que BES1 y BZR1 actúan también como represores de la síntesis de BRs, es posible que en el fondo *bzr1-1D* la fosforilación de PIF4 sea mayor y la proteína sea más inestable, lo que explicaría la respuesta hipersensible a BRZ de estos mutantes en la luz. Sin embargo, este modelo no encaja con la respuesta insensible a BRZ, reportada para los mutantes *bes-1d*. De hecho pudimos ver que estos mutantes, muestran una respuesta hiposensible a BRZ en luz, pero no son totalmente insensibles a este inhibidor.

Como se muestra en la Figura 31, el mutante *bes1-D* es efectivamente más pequeño en BRZ y en presencia de este inhibidor muestra una reducción en los niveles de activación de los genes diana *PIL1* y *PRE5*. Cabe también destacar que las plántulas *bes1-D* son apenas un poco más altas que Col-0, aunque en este mutante BES1 está constitutivamente activado. Las líneas PIF41A, por el contrario, muestran hipocotilos mucho más largos que Col-0, aunque en BRZ el crecimiento del hipocotilo se ve reducido. Esto indicaría que esta forma no fosforilable de la proteína PIF4 requiere de la actividad de BES1/BZR1 (en presencia de BRZ estos factores se fosforilan y degradan) para promover la elongación celular. Para testar esta hipótesis, decidimos introducir la mutación de ganancia de función *bes1-D* en las líneas *pPIF4::PIF41A*, para comprobar si la expresión conjunta de estos dos factores constitutivamente activos era capaz de conferir una repuesta insensible a BRZ en luz. Como se aprecia en la Figura 31A y la Figura 31B, las plantas PIF41A *bes1d* crecidas en luz presentan longitudes similares de los hipocotilos tanto en el tratamiento control como en el tratamiento con BRZ, lo que demuestra que en la luz la forma no fosforilada de ambos factores es necesaria para promover el crecimiento del hipocotilo.

RESULTADOS

Además, los análisis de expresión génica mediante qPCR confirmaron que la acumulación de las formas no fosforilables de PIF4 y BES1 conduce a niveles constitutivamente altos de expresión de los genes diana *PIL1*, *XTR7* y *PRE5*, independientemente de la presencia de BRZ (Figura 31C).

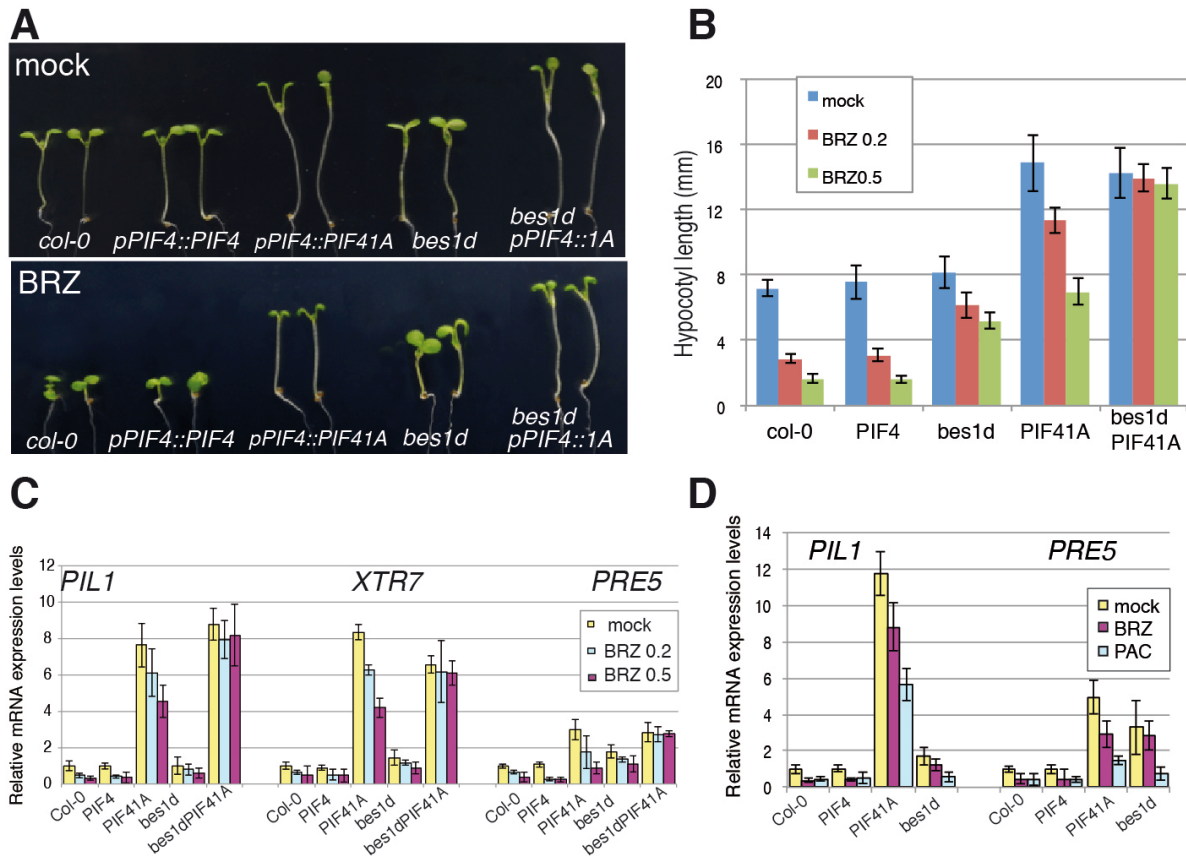


Figura 31. Las plantas *PIF41Abes1-D* son insensibles a BRZ en luz. (A)** Fenotipo de las plantas *pPIF4::PIF4*, *pPIF4::PIF41A*, *bes1-D* y *bes1-D pPIF4::PIF41A* crecidas durante 5 días en luz roja en medio MS (mock, panel superior) y medio MS + 0,5 μ M BRZ (panel inferior). Tanto *Col-0* como *bes1-D*, *pPIF4::PIF4* y *pPIF4::PIF41A* presentan una reducción en el crecimiento del hipocotilo en el tratamiento con BRZ, mientras que las plantas *bes1-D pPIF4::PIF41A* son insensibles a BRZ. **(B)** Medidas de los hipocotilos de las plantas crecidas en medio MS (mock) y MS + 0,2 μ M BRZ y 0,5 μ M BRZ. Las barras de error representan la desviación estándar SD con un $n = 20$. El tratamiento con 0,2 μ M BRZ provoca una disminución del crecimiento del hipocotilo en las plantas *PIF4*, *bes1-D* y *PIF41A*, siendo este más severo en el tratamiento con 0,5 μ M BRZ. Este efecto no se produce en las plantas *bes1-D PIF41A*, que muestran una longitud similar en todos los tratamientos. **(C)** Análisis cuantitativo mediante qRT PCR de los niveles de expresión de los genes *PIL1*, *XTR7* y *PRE5* en *Col-0*, *bes1-D* y líneas que sobre-expresan las proteínas *PIF4* y *PIF41A* y en las plantas *bes1-D PIF41A*. Las plantas se crecieron como se ha descrito anteriormente. Las plantas *bes1-D PIF41A* muestran una activación constitutiva de los genes *PIL1*, *XTR7* y *PRE5*, también en BRZ, lo que evidencia un fenotipo totalmente insensible a BRZ. **(D)** Análisis cuantitativo mediante qRT PCR de los niveles de expresión de los genes *PIL1* y *PRE5* en *Col-0*, *bes1-D*, y las líneas que sobre-expresan las proteínas *PIF4* y *PIF41A*. Las plantas se crecieron en condiciones de luz roja continua durante 5 días en medio MS (mock), y MS con 0,5 μ M BRZ o 0,5 μ M PAC. El tratamiento con PAC disminuye considerablemente la expresión de los genes diana en *PIF4*, *PIF41A* y en *bes1-D*. Las plantas *PIF4* y *bes1-D* muestran una respuesta parcialmente insensible a BRZ. Los niveles de expresión de los genes se normalizaron con los niveles de *PP2A* y se muestran referidos a los niveles de expresión de *Col-0*. Las barras de error son \pm SEM de 2 réplicas biológicas.

RESULTADOS

Estos resultados demuestran que la señalización por BRs tiene un papel preponderante en la elongación del hipocotilo al suprimir la actividad de la quinasa BIN2. La inactivación de esta quinasa permite la estabilización del factor PIF4 y la acumulación en el núcleo de los factores BES1/BZR1, la función concertada de estas dos familias de reguladores es esencial para el crecimiento de la planta.

DISCUSIÓN

El crecimiento y desarrollo de las plantas depende mayoritariamente de la luz y la temperatura. La luz aporta la energía necesaria para la fotosíntesis, además de ofrecer información de los cambios estacionales y del entorno en que la planta se desarrolla. La acción coordinada de la luz, la temperatura, el reloj endógeno y las hormonas giberelinas (GA) y brasinosteroides (BR) modulan el crecimiento de la planta durante todo su ciclo de vida, a través del control de la expresión de diferentes genes implicados en elongación celular. Después de la germinación las plantas deben adaptarse a los cambios que se producen en su entorno inmediato, para ello necesitan integrar la información externa con sus propios programas de desarrollo, lo que les permite modular el crecimiento de sus diferentes órganos y el momento en que se inicia la floración. Este intercambio de información está controlado por factores de transcripción que determinan cómo y cuándo se expresan sus diferentes genes. Una de las familias mejor caracterizadas de factores de transcripción implicados en regular el crecimiento de la planta son los PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs). Los miembros de esta familia de bHLH actúan como reguladores centrales de la elongación celular, activando la expresión de genes implicados en la remodelación de la pared celular y genes relacionados con auxinas (Leivar and Quail, 2011). La caracterización de diferentes mutantes de PIF y líneas sobre-expresoras de estos factores ha puesto de manifiesto la importancia que estos factores tienen en promover el crecimiento de la planta (Duek and Fankhauser, 2005; Leivar et al., 2008). Los PIFs activan la expresión de genes implicados en expansión celular, al unirse a motivos G-box y E-box conservados en los promotores de sus genes diana (Bai et al., 2012; de Lucas et al., 2008; Leivar et al., 2008; Toledo-Ortiz et al., 2003). Aunque inicialmente identificados como interactores de los fitocromos, se ha podido establecer que la actividad de los PIFs no está únicamente regulada por la luz. El reloj circadiano (Nozue and Maloof, 2006), la temperatura (Koini et al., 2009), las hormonas GA (de Lucas et al., 2008) y BRs (Bai et al., 2012) afectan también la actividad transcripcional de estos factores. Recientemente se ha demostrado que PIF4 interacciona con los factores BES1/BZR1, y que ambos factores actúan de forma interdependiente, activando la expresión de múltiples genes regulados por BRs (Oh et al., 2012).

Los resultados presentados en este trabajo descubren un mecanismo adicional que actúa como mediador de la regulación cruzada entre las rutas de GA y BRs, con el fin de promover la elongación celular. Ambas rutas convergen en un regulador central del crecimiento, el factor PIF4. Las plantas necesitan de una ruta de BRs activa, para crecer en respuesta a GAs, las cuales

reverten la represión producida por las proteínas DELLA. La aplicación de BRs promueve la acumulación de una forma de la proteína PIF4 con mayor movilidad electroforética, la cual hemos demostrado que corresponde a una forma no fosforilada de este factor, lo que indica que los BRs controlarían la actividad de una quinasa responsable de fosforilar y desestabilizar a PIF4. Mostramos que PIF4 se une a la GSK3 quinasa BIN2, que actúa como un regulador negativo de la ruta de señalización de BRs, tanto en levadura como en ensayos BiFC y de co-imunoprecipitación *in vivo*. Mostramos también que BIN2 fosforila a la proteína PIF4 *in vitro*, y que una mutación en uno de los sitios conservados de fosforilación resulta en una fuerte estabilización de la proteína PIF4. Las plantas que expresan la proteína PIF41A mutada, bajo control de su propio promotor, muestran un fenotipo alargado, característico de plantas crecidas en condiciones de sombra o elevadas temperatura y en estas plantas el crecimiento del hipocotilo es similar en el día y en la noche. Así, podemos concluir que PIF4 actúa como un sustrato de fosforilación de BIN2 y que esta modificación desestabiliza a la proteína PIF4 preferentemente al final de la noche, lo que indica un incremento en los niveles de BRs al final de la noche es esencial para definir la fase de máxima elongación del hipocotilo.

Interacción entre las rutas de señalización GA y BR

Los BRs ejercen una función sinérgica con las GAs para promover la elongación del hipocotilo y el patrón etiolado de los brotes en plántulas germinadas en oscuridad. Los mutantes deficientes o insensibles a BRs, en efecto, se caracterizan por presentar un fenotipo enano y un crecimiento de-etiolado en oscuridad, incluso más acentuado que el de los mutantes afectados en la síntesis o señalización de GAs. La aplicación de GAs es incapaz de recuperar el crecimiento del mutante *det2-1*, deficiente en BRs, o *bri1-1*, insensible a BRs, lo que sugeriría que la ruta de BRs actúa por debajo de la ruta de señalización de GAs (Bai et al., 2012).

En este trabajo observamos que la aplicación de BRs no sólo mejora la germinación de los mutantes insensibles a GA, *gai1* y *sly1-10* (Steber and McCourt, 2001), sino que además recupera el fenotipo enano de éstos mutantes, así como el del mutante deficiente en GA, *ga1-3*. Los experimentos realizados con PAC (inhibidor de la síntesis de GAs) y con BRZ (inhibidor de la síntesis de BRs) en plantas silvestres probaron que el aporte exógeno de BRs revierte el fenotipo enano causado por el PAC, mientras que las GAs son incapaces de rescatar el fenotipo enano causado por la aplicación de BRZ. Estos resultados indican que las plantas necesitan una ruta de señalización de BRs activa para poder responder de forma correcta a las GAs.

Para determinar en qué etapa de la ruta de señalización de GA inciden los BRs, decidimos analizar dos puntos clave de esta ruta de señalización, i.e. la percepción de estas hormonas por el

DISCUSIÓN

receptor GID1 y la desestabilización de los represores DELLA en respuesta a la aplicación de GAs. El receptor de GA, GID1a, no se ve afectado por la aplicación de BL, GA₃, ni de ninguno de los inhibidores de biosíntesis, por lo que los BRs no parecen afectar la estabilidad de este receptor. La degradación de las proteínas DELLA, en respuesta a GA, tampoco se ve afectada en los mutantes *det2-1*, deficientes en BRs, dado que la aplicación de GA provoca una degradación de estas proteínas similar a la que se observa en las plantas silvestres. Sin embargo, en el mutante *det2-1* la degradación de las DELLAs no se traduce en una elongación del hipocotilo, lo que sugiere que los BRs actúan por debajo de las DELLAs. Además, la aplicación de BRZ en el quintuple mutante *global*, provoca aún una inhibición del crecimiento del hipocotilo, mientras que estas plantas muestran una respuesta exagerada a BL. Estos resultados corroboran que existe un componente regulador que sirve de nexo entre las rutas de señalización GA y BR y que se encuentra por debajo de las proteínas DELLA.

Dado que se había establecido que las proteínas DELLA reprimen el crecimiento de la planta al unirse a los factores de transcripción PIF y bloquear su unión al ADN (de Lucas et al., 2008; Feng et al., 2008), decidimos analizar si los BRs podrían estar actuando a nivel de estos factores. Para ello, analizamos si la aplicación de BL y BRZ afectaba los niveles de acumulación de la proteína PIF4.

PIF4 actúa como integrador de las rutas de señalización GA y BR

La aplicación de BL provoca una rápida acumulación de la proteína PIF4 en oscuridad, mientras que el tratamiento con BRZ genera una desestabilización de la proteína. Al mismo tiempo que la proteína se estabilizaba, observamos que la aplicación de BL provoca un cambio en la movilidad electrofóretica de PIF4, el cual demostramos que corresponde a un cambio en el estado de fosforilación de la proteína, ya que tras la incubación de los extractos con la fosfatasa CIP, se observa únicamente la banda de mayor movilidad.

Las plantas sobre-expresoras de PIF4 muestran un fenotipo similar al producido por aplicación exógena de BRs, una respuesta hipersensible a BL y una menor inhibición de la elongación del hipocotilo en presencia del inhibidor BRZ. Por el contrario, las plantas *pif4pif5* presentan una respuesta hipersensible a BRZ y apenas responden al tratamiento con BL. Además, en respuesta a GA + BRZ, las líneas PIF4OX y los mutantes *phyB* (acumulan altos niveles de PIFs), elongan el hipocotilo al igual que el mutante *bes1-D*, con una respuesta constitutiva a BRs. Esta respuesta no se observa en Col-0, lo que indicaría que la sobre-expresión de PIF4 o los PIFs provoca una activación de la ruta de BRs. En relación con este resultado, el análisis transcriptómico de los genes que se encuentran inducidos en las plantas PIF4OX, y

reprimidos en el mutante *pifq*, mostró un notable solapamiento con los genes regulados por BRs. Los genes inducidos por PIF4 están en efecto enriquecidos en numerosos genes regulados positivamente por los BR, y en particular en genes implicados en la remodelación de la pared celular y en la síntesis y señalización de auxinas.

Los BRs modulan la estabilidad del factor PIF4

La GSK3 quinasa BIN2 regula negativamente la ruta de señalización de los BRs, al fosforilar los factores de transcripción BES1/BZR1, lo que provoca su exclusión del núcleo y degradación por el sistema proteasoma. Por ello, decidimos analizar si BIN2 se correspondía también con la quinasa que fosforila y desestabiliza a PIF4 en ausencia de BRs.

En ensayos doble híbrido y pull-down *in vitro*, observamos que PIF4 interacciona directamente con BIN2, esta interacción se confirmó también *in vivo* mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y complementación bimolecular BiFC. En ensayos de fosforilación *in vitro* demostramos que PIF4 es un sustrato de la quinasa BIN2.

En estudios de la actividad transcripcional de PIF4, en líneas transgénicas que expresan la fusión *pPIL1::LUC*, un gen diana de PIF4, observamos que BIN2 regula la actividad transcripcional de PIF4. La expresión de *PIL1* se activa en respuesta a una baja proporción de luz roja/roja lejana (R/FR), debido a que en estas condiciones PHYB se revierte a su forma Pr inactiva, lo que conlleva una estabilización de PIF4. Las líneas *pPIL1::LUC* presentan una alta actividad luciferasa en respuesta a luz roja lejana, y el tratamiento con BRZ suprime esta respuesta. La aplicación de BL contrarresta los efectos negativos del BRZ, y el LiCl, un inhibidor específico de BIN2, ejerce un efecto similar a BL. Además, en presencia de LiCl, las GAs con capaces de inducir la expresión de este gen aún en plantas tratadas con BRZ. Estos resultados demuestran que la activación de *PIL1* es mayor cuando BIN2 se inhibe por BL o LiCl, lo que sugiere que esta quinasa regula de manera directa la actividad transcripcional de PIF4.

La mutación PIF41A, en la que se eliminó uno de los sitios consenso de fosforilación de BIN2 (S/T-X-X-X-S/T), el cual está conservado en todos los ortólogos de PIF4, produce una notable estabilización de la proteína PIF4. Las plantas PIF41A tienen un fenotipo extremadamente alargado y floración temprana, y además presentan una reducida sensibilidad a BRZ. La mutación PIF41A, sin embargo, suprime, sólo en parte, el fenotipo enano de los mutantes *bin2-1*, debido a una activación constitutiva de BIN2. Esta reversión parcial indica que hay otros factores regulados por BIN2 que son también esenciales para el crecimiento del hipocotilo.

BIN2 fosforila a los factores BES1/BZR1 en múltiples sitios, las proteínas fosforiladas no se unen al ADN y son excluidas del núcleo, dado que interaccionan con las proteínas 14-3-3

citósolicas y son enviadas al proteasoma para su degradación (Gampala et al., 2007; Vert and Chory, 2006; Zhao et al., 2002). Estudios recientes han demostrado que BZR1 interacciona con PIF4 y que estos factores forman un complejo que se une a los promotores de multitud de genes dianas co-regulados por PIF4 y BZR1 (Oh et al., 2012). La activación de estos genes requiere de los factores PIF, puesto que el mutante cuádruple *pifq* suprime el fenotipo insensible a BRZ de los mutantes *bzr1-1D*. La pérdida de función de estos factores suprime también el fenotipo alargado de los mutantes *bzr1-1D*, de modo que las líneas *bzr1-1D pifq* muestran hipocotilos igual de cortos que los mutantes *pifq*. Curiosamente, los mutantes constitutivos *bzr1-1D* son insensibles a BRZ en oscuridad, pero muestran una respuesta hipersensible a este inhibidor en la luz. Los mutantes *bes1-D*, por el contrario, son insensibles a BRZ tanto en oscuridad como en luz, aunque por el momento no se explica a que se debe esta diferencia, ya que ni BES1, ni BZR1 parecen estar regulados por luz. En este trabajo hemos demostrado que las plantas *bes1-D* no son totalmente insensibles a BRZ en la luz, ya que aún muestran una inhibición en el crecimiento del hipocotilo y una expresión reducida de los genes *PIL1* y *PRE5*, en presencia de este inhibidor. Estos resultados sugieren que en presencia de BRZ, BIN2 es capaz de fosforilar y desestabilizar a PIF4, independientemente de que BES1 esté constitutivamente activo en este fondo mutante, lo que haría que la expresión de los genes diana *PIL1* y *PRE5* se reprima. Por esta razón decidimos expresar la proteína mutada PIF41A en las plantas *bes1-D*. El resultado de este cruce se tradujo en plantas altas, totalmente insensibles a BRZ, ya que expresan niveles igualmente elevados de los genes *PIL1*, *XTR7* y *PRE5*, en ausencia y en presencia de este inhibidor. Estos resultados demuestran que la señalización por BRs no sólo induce la defosforilación de los factores BES1/BZR1 sino también la de PIF4, y que la acción concertada de estas dos familias de reguladores transccripcionales es necesaria para el crecimiento de las plantas.

La forma no fosforilable de PIF4 y los factores BES1/BZR1 son necesarios para la elongación celular

Los mutantes *bzr1-1D* y *bes1-D* expresan constitutivamente los factores BES/BZR1, debido a una mutación idéntica en el dominio PEST, que incrementa su afinidad de unión a la proteína PP2A, encargada de defosforilar y activar estos factores (Tang et al., 2011). La mutación *bzr1-1D* suprime el fenotipo enano de los mutantes *bri1-116* en oscuridad pero no en luz. Se ha visto que la sobre-expresión de la proteína PIF4 aumenta el tamaño del hipocotilo de las plantas *bzr1-1D bri1-116* (Oh et al., 2012), pero estas plantas siguen siendo más pequeñas que las líneas PIF4OX. A su vez, se ha reportado que la sobre-expresión de la subunidad B de PP2A genera una reducida sensibilidad a BRZ, similar a la de la mutación *bzr1-1D*, pero es incapaz de recuperar el fenotipo enano de las plantas *bri1-5*, a pesar que estas plantas acumulan la proteína BZR1 defosforilada

(Tang et al., 2011).

Otros estudios han demostrado que la interacción de BIN2 con BZR1 ocurre a través de un dominio DM (*docking motif*) situado cerca del extremo C-terminal de la proteína BZR1 (Peng et al., 2010). La delección del dominio DM elimina completamente la fosforilación de BZR1 y promueve una fuerte acumulación de la proteína BZR1(Δ DDM)-GFP. Sin embargo, de la misma forma que le ocurre a nuestra mutación PIF41A, BZR1(Δ DM) solo es capaz de suprimir el fenotipo enano de los mutantes heterocigotos *bin2-1* (Peng et al., 2010). Todos estos resultados, junto con lo expuestos en este trabajo, estarían de acuerdo con un modelo de acción por el cual BIN2 además de fosforilar a BES1/BZR1, fosforila a PIF4 y promueve su desestabilización en la luz, lo que hace que en luz sea necesaria la expresión de las formas no fosforilables de ambos factores (PIF41A y *bzr1-1D* o *bes1D*) para el crecimiento de la planta.

La acción conjunta de los PIFs con BES1/BZR1 modulan el patrón diurno de crecimiento del hipocotilo

En condiciones diurnas donde se alternan los periodos de luz y oscuridad, el crecimiento del hipocotilo no es continuo sino que, en días cortos, la elongación es máxima al amanecer. A este periodo de rápida elongación, le sigue una fase de crecimiento muy limitado durante el día y primera mitad de la noche. Esta ampliamente aceptado que este crecimiento rítmico depende de la coincidencia de la presencia de luz y la transcripción de los PIFs, la cual está regulada por el reloj. La transcripción de PIF4 se induce al final de la noche, y se mantiene elevada durante el día, para caer de nuevo al anochecer, donde el complejo formado por las proteínas ELF3, ELF4 y LUZ, reprime la expresión de este gen (Nusinow et al., 2011). En presencia de luz, la forma fotoactiva de PHYB induciría la rápida degradación de la proteína PIF4, lo que suprime la elongación del hipocotilo durante el día. En la noche, la progresiva reversión de la forma activa Pfr, permite que PIF4 se acumule al final de la noche, lo que se traduciría en una rápida elongación del hipocotilo al amanecer (Monte et al., 2004; Nozue et al., 2007; Shen et al., 2005; Yamashino et al., 2013).

En este trabajo aportamos evidencias experimentales que demuestran que la regulación rítmica del hipocotilo es algo más compleja de lo que está actualmente aceptado, ya que hemos observado que la proteína PIF4 no desaparece durante el día, sino que sigue un patrón de acumulación similar al de su transcrito. Generamos líneas transgénicas *pif4pif5* que expresaban las proteínas PIF4-HA y PIF41A-HA bajo el control de su propio promotor y seleccionamos aquellas líneas que acumulaban niveles de transcrito equivalentes a los de las plantas silvestres. Las plantas PIF4-HA, en efecto, muestran la misma longitud del hipocotilo que Col-0, y en respuesta a distintos tratamientos, muestran los mismos niveles de expresión de los genes diana

DISCUSIÓN

PIL1 y *PRE5*. Las plantas PIF41A-HA, por el contrario, se caracterizaron por presentar un fenotipo parecido al de las plantas silvestres crecidas en la sombra o a elevadas temperaturas. Estas plantas mostraron ser más altas que los mutantes *bes1-D*, y aunque no son insensibles a BRZ, en presencia de este inhibidor muestran aún niveles elevados de expresión de los genes *PIL1* y *PRE5*, lo que indica que la fosforilación de PIF4 es en parte responsable de la inhibición de la transcripción de estos genes, hecho que se observa en las líneas silvestres en presencia de BRZ.

En los estudios de western blot en los que estudiamos el perfil diurno de acumulación de las proteínas PIF4 y PIF41A, observamos que la proteína PIF4 silvestre empieza a acumularse al final de la noche, pero tiene su máximo de acumulación durante el día, para luego decrecer al comienzo de la noche. La proteína PIF41A mostro acumularse a niveles mayores, especialmente al final de la noche (ZT22) e inmediatamente después de encenderse la luz (ZT0-ZT2) y esta acumulación coincide con una abundancia mayor de la isoforma de mayor movilidad electroforética. Esto indicaría que la fosforilación de PIF4, en las líneas silvestres, determina que la proteína sea menos estable no solo durante el día sino especialmente al final de la noche.

Cabe destacar que las plantas PIF41A mostraron un crecimiento continuado del hipocotilo, lo que indica que la fosforilación de PIF4 juega un papel importante en establecer la fase del día en que el crecimiento del hipocotilo es máximo. Dado que esta respuesta diferencial se debe a la mutación generada en el sitio de fosforilación por BIN2, estos resultados sugieren que las oscilaciones diurnas en los niveles endógenos de BRs, deben de ejercer un papel preponderante en el crecimiento rítmico del hipocotilo.

De hecho, se sabe que tanto los genes de síntesis como de respuesta a estas hormonas, muestran un pico de expresión que en días cortos coincide con el amanecer (Michael et al., 2008; Yamashino et al., 2013). Este perfil de expresión génica solapa con la fase de máxima elongación del hipocotilo lo que indica que esta oscilación no es casual sino que juega un importante papel en definir cuando ocurre el crecimiento del hipocotilo. En estudios en los que se complementó el mutante *bri1-116* con la construcción *AtML1::BR1* se observó que estas plantas mostraban un crecimiento mayor del hipocotilo que las líneas silvestres, debido a que el promotor *AtML1* generaba una expresión del receptor de BRs durante el principio de la noche, momento en el que el gen endógeno apenas se expresa (Michael et al., 2008). Por lo tanto, la señalización de BRs tiene una papel fundamental en la elongación del hipocotilo, otorgando solidez al patrón de crecimiento rítmico de la planta.

En este trabajo se demuestra que BIN2 no sólo regula la acumulación nuclear de los factores BES1 y BZR1, sino también la estabilidad de PIF4. Así, la acción concertada de estas dos familias de factores de transcripción, aporta un mecanismo fácilmente modulable de integración de

DISCUSIÓN

las señales externas y endógenas de la planta, lo que permite una adaptación flexible del crecimiento y desarrollo de la planta, en función de los cambios ambientales.

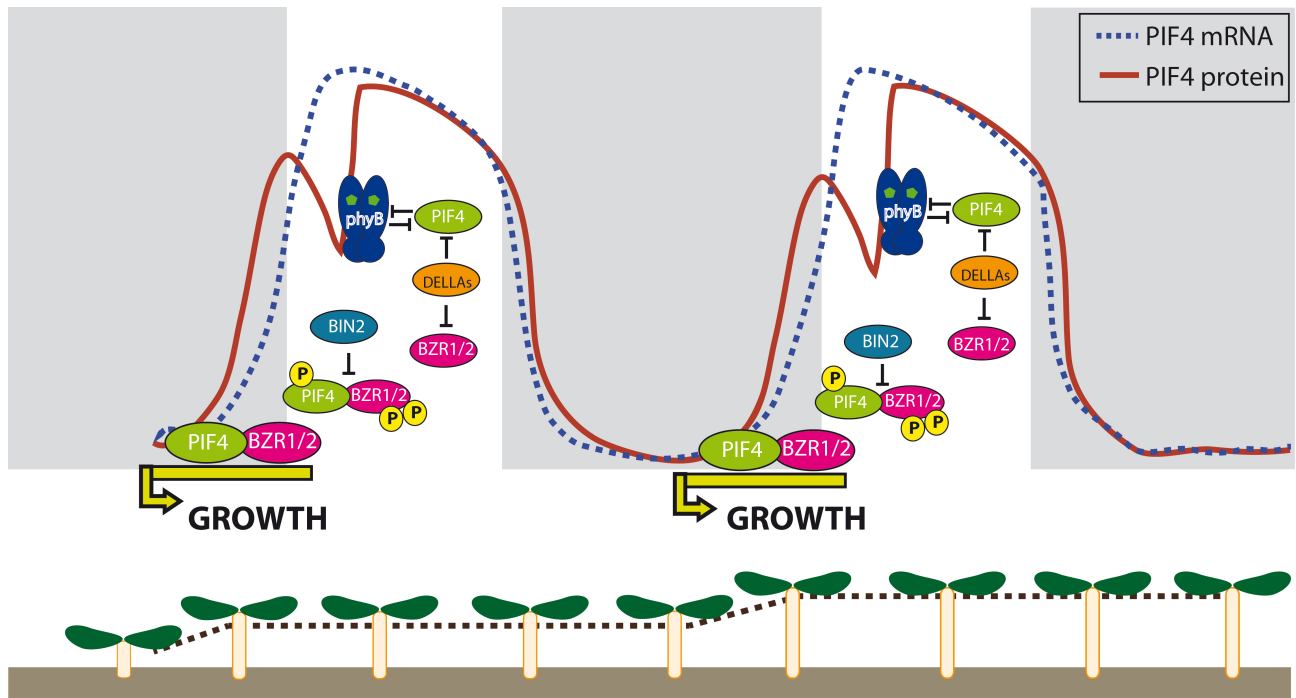


Figura 32. Modelo propuesto para la regulación de PIF4. En condiciones de día corto el crecimiento del hipocotilo es máximo al amanecer. Los factores PIF4 y BES1/BZR1 se acumulan al final del día y juntos promueven la elongación del hipocotilo. Al amanecer, la GSK3 quinasa BIN2 regula negativamente a estos factores, promueve su fosforilación y la degradación a través del sistema proteasoma, impidiendo así su unión al ADN. PIF4 es fosforilado rápidamente por los fitocromos en luz. Además de phyB las proteínas DELLA regulan negativamente a PIF4 y a BES1/BZR1.

CONCLUSIONES

1. Las plantas necesitan una ruta de señalización de brasinosteroides activa para poder responder de forma correcta a las giberelinas. Las ruta de BRs converge con la de GAs en un componente por debajo de las proteínas DELLA.
2. Los brasinosteroides promueven la acumulación de una forma de PIF4 con mayor movilidad electroforética, que corresponde a la proteína no-fosforilada. Ello indica que los BRs estabilizan a PIF4 al inhibir a la quinasa responsable de fosforilar este factor y señalizar su degradación por el sistema proteasoma.
3. Las líneas PIF4OX muestran una respuesta hipersensible a BL y son parcialmente resistentes a BRZ. Además, los genes regulados por PIF4 muestran un porcentaje significativo de solapamiento con los genes regulados por BRs.
4. PIF4 interacciona con la GSK3 quinasa BIN2, que actúa como un regulador negativo de la ruta de señalización de BRs. En ensayos de fosforilación *in vitro* BIN2 fosforila a PIF4, y la incubación con el inhibidor específico *bikinina*, bloquea esta modificación.
5. La mutación de una diana consenso de fosforilación de BIN2 (S/T-X-X-X-S/T), conservada en todos los homólogos de PIF4, provoca una estabilización de la proteína mutante PIF41A. Líneas estables de *Arabidopsis* que sobre-expresan esta proteína presentan un fenotipo extremadamente alargado y floración muy temprana, tal y como esperaríamos para una fuerte estabilización de este factor.
6. La sobre-expresión de PIF41A es sólo capaz de suprimir el fenotipo enano de los mutantes heterocigotos *bin2-1*, causado por la estabilización de BIN2. Este efecto parcial indica que además de PIF4, otros factores regulados por BIN2 son también necesarios para promover el crecimiento del hipocotilo. En efecto, en un trabajo reciente se ha reportado que BES1 y BZR1 interaccionan con PIF4 y funcionan como co-activadores de este factor.
7. La fosforilación por BIN2 desestabiliza a la proteína PIF4 preferencialmente al amanecer. PIF4 empieza a acumularse al final de la noche, alcanza niveles máximos durante el día y decae al inicio de la noche. La proteína mutada PIF41A, se acumula a niveles superiores, especialmente

CONCLUSIONES

al final de la noche e inmediatamente después de que se encienda la luz.

8. Las plantas *PIF41Abes1-d* son insensibles a BRZ en luz. Esto indica que la inactivación de BIN2 en respuesta a BRs, promueve no sólo la estabilización de BES1/BZR1, sino también de PIF4, y que una acción concertada de estas dos familias de reguladores es esencial para el crecimiento de la planta. Mediante este doble mecanismo de regulación, los BRs ejercen un control extremadamente sensible de la elongación celular, a la vez que permiten una respuesta flexible en función de las condiciones ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

Achard, P., and Genschik, P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot* 60, 1085-1092.

Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P., and Genschik, P. (2008). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* 20, 2117-2129.

Adie, B.A., Perez-Perez, J., Perez-Perez, M.M., Godoy, M., Sanchez-Serrano, J.J., Schmelz, E.A., and Solano, R. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 1665-1681.

Al-Sady, B., Kikis, E.A., Monte, E., and Quail, P.H. (2008). Mechanistic duality of transcription factor function in phytochrome signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2232-2237.

Al-Sady, B., Ni, W., Kircher, S., Schafer, E., and Quail, P.H. (2006). Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Mol Cell* 23, 439-446.

Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2009). Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Mol Biol* 69, 409-417.

An, F., Zhang, X., Zhu, Z., Ji, Y., He, W., Jiang, Z., Li, M., and Guo, H. (2012). Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated Arabidopsis seedlings. *Cell Res* 22, 915-927.

Ariizumi, T., Murase, K., Sun, T.P., and Steber, C.M. (2008). Proteolysis-independent downregulation of DELLA repression in Arabidopsis by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. *Plant Cell* 20, 2447-2459.

Arnaud, N., Girin, T., Sorefan, K., Fuentes, S., Wood, T.A., Lawrenson, T., Sablowski, R., and Ostergaard, L. (2010). Gibberellins control fruit patterning in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev* 24, 2127-2132.

Arsovski, A.A., Galstyan, A., Guseman, J.M., and Nemhauser, J.L. (2012). Photomorphogenesis. *Arabidopsis Book* 10, e0147.

Asami, T., Mizutani, M., Fujioka, S., Goda, H., Min, Y.K., Shimada, Y., Nakano, T., Takatsuto, S., Matsuyama, T., Nagata, N., *et al.* (2001). Selective interaction of triazole derivatives with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase of the brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in planta. *J Biol Chem* 276, 25687-25691.

Azpiroz, R., Wu, Y., LoCascio, J.C., and Feldmann, K.A. (1998). An Arabidopsis brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell* 10, 219-230.

Bai, M.Y., Shang, J.X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T.P., and Wang, Z.Y. (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nat Cell Biol* 14, 810-817.

Bai, M.Y., Zhang, L.Y., Gampala, S.S., Zhu, S.W., Song, W.Y., Chong, K., and Wang, Z.Y. (2007). Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13839-13844.

Bauer, D., Viczian, A., Kircher, S., Nobis, T., Nitschke, R., Kunkel, T., Panigrahi, K.C., Adam, E., Fejes, E., Schafer, E., *et al.* (2004). Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple

- photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1433-1445.
- Belda-Palazon, B., Ruiz, L., Marti, E., Tarraga, S., Tiburcio, A.F., Culianez, F., Farras, R., Carrasco, P., and Ferrando, A. (2012). Aminopropyltransferases involved in polyamine biosynthesis localize preferentially in the nucleus of plant cells. *PLoS One* **7**, e46907.
- Belkhadir, Y., and Chory, J. (2006). Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. *Science* **314**, 1410-1411.
- Bolle, C. (2004). The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* **218**, 683-692.
- Bu, Q., Zhu, L., Dennis, M.D., Yu, L., Lu, S.X., Person, M.D., Tobin, E.M., Browning, K.S., and Huq, E. (2011). Phosphorylation by CK2 enhances the rapid light-induced degradation of phytochrome interacting factor 1 in Arabidopsis. *J Biol Chem* **286**, 12066-12074.
- Calderon-Villalobos, L.I., Kuhnle, C., Li, H., Rosso, M., Weissshaar, B., and Schwechheimer, C. (2006). LucTrap vectors are tools to generate luciferase fusions for the quantification of transcript and protein abundance in vivo. *Plant Physiol* **141**, 3-14.
- Castillon, A., Shen, H., and Huq, E. (2007). Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* **12**, 514-521.
- Chandler, P.M., Marion-Poll, A., Ellis, M., and Gubler, F. (2002). Mutants at the Slender1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol* **129**, 181-190.
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J.P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M.J., Genschik, P., and Achard, P. (2011). DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 1849-1860.
- Chen, M., Chory, J., and Fankhauser, C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annu Rev Genet* **38**, 87-117.
- Chen, M., Galvao, R.M., Li, M., Burger, B., Bugea, J., Bolado, J., and Chory, J. (2010). Arabidopsis HEMERA/pTAC12 initiates photomorphogenesis by phytochromes. *Cell* **141**, 1230-1240.
- Cheng, H., Qin, L., Lee, S., Fu, X., Richards, D.E., Cao, D., Luo, D., Harberd, N.P., and Peng, J. (2004). Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development* **131**, 1055-1064.
- Chiang, G.C., Barua, D., Kramer, E.M., Amasino, R.M., and Donohue, K. (2009). Major flowering time gene, flowering locus C, regulates seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11661-11666.
- Choe, S., Dilkes, B.P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakurai, A., and Feldmann, K.A. (1998). The DWF4 gene of Arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22alpha-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell* **10**, 231-243.
- Chory, J., Nagpal, P., and Peto, C.A. (1991). Phenotypic and Genetic Analysis of det2, a New Mutant That Affects Light-Regulated Seedling Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **3**, 445-459.
- Christie, J.M. (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 21-45.
- Clack, T., Shokry, A., Moffet, M., Liu, P., Faul, M., and Sharrock, R.A. (2009). Obligate heterodimerization of Arabidopsis phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Cell* **21**, 786-799.
- Clough, R.C.a.V., R (1997). Phytochrome degradation. *Plant Cell Environment* **20**, 713-721.

- Clouse, S.D. (2011). Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *Plant Cell* 23, 1219-1230.
- Clouse, S.D., Langford, M., and McMorris, T.C. (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 111, 671-678.
- Clouse, S.D., and Sasse, J.M. (1998). BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 427-451.
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C., and Pearl, L.H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* 105, 721-732.
- de Lucas, M., Daviere, J.M., Rodriguez-Falcon, M., Pontin, M., Iglesias-Pedraz, J.M., Lorrain, S., Fankhauser, C., Blazquez, M.A., Titarenko, E., and Prat, S. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* 451, 480-484.
- de Lucas, M., and Prat, S. (2014). PIFs get BRright: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORs as integrators of light and hormonal signals. *New Phytol*.
- De Rybel, B., Audenaert, D., Vert, G., Rozhon, W., Mayerhofer, J., Peelman, F., Coutuer, S., Denayer, T., Jansen, L., Nguyen, L., *et al.* (2009). Chemical inhibition of a subset of *Arabidopsis thaliana* GSK3-like kinases activates brassinosteroid signaling. *Chem Biol* 16, 594-604.
- Depuydt, S., and Hardtke, C.S. (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol* 21, R365-373.
- Dill, A., and Sun, T. (2001). Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159, 777-785.
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M., and Sun, T.P. (2004). The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* 16, 1392-1405.
- Doble, B.W., and Woodgett, J.R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116, 1175-1186.
- Duek, P.D., and Fankhauser, C. (2003). HFR1, a putative bHLH transcription factor, mediates both phytochrome A and cryptochrome signalling. *Plant J* 34, 827-836.
- Duek, P.D., and Fankhauser, C. (2005). bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signalling. *Trends Plant Sci* 10, 51-54.
- Endo, M., Nakamura, S., Araki, T., Mochizuki, N., and Nagatani, A. (2005). Phytochrome B in the mesophyll delays flowering by suppressing FLOWERING LOCUS T expression in *Arabidopsis* vascular bundles. *Plant Cell* 17, 1941-1952.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A., and Quail, P.H. (2000). HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* 14, 2377-2391.
- Fankhauser, C., and Chen, M. (2008). Transposing phytochrome into the nucleus. *Trends Plant Sci* 13, 596-601.
- Fankhauser, C., and Chory, J. (1997). Light control of plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 203-229.
- Favory, J.J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravec, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G.I., Oakeley, E.J., *et al.* (2009). Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *Embo J* 28, 591-601.

- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J.M., Kircher, S., *et al.* (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**, 475-479.
- Feurtado, J.A., Huang, D., Wicki-Stordeur, L., Hemstock, L.E., Potentier, M.S., Tsang, E.W., and Cutler, A.J. (2011). The *Arabidopsis* C2H2 zinc finger INDETERMINATE DOMAIN1/ENHYDROUS promotes the transition to germination by regulating light and hormonal signaling during seed maturation. *Plant Cell* **23**, 1772-1794.
- Fleet, C.M., and Sun, T.P. (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 77-85.
- Frame, S., and Cohen, P. (2001). GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* **359**, 1-16.
- Frame, S., Cohen, P., and Biondi, R.M. (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* **7**, 1321-1327.
- Franklin, K.A., and Quail, P.H. (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J Exp Bot* **61**, 11-24.
- Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N., and Harberd, N.P. (2004). The *Arabidopsis* mutant *sleepy1gar2-1* protein promotes plant growth by increasing the affinity of the SCFSLY1 E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell* **16**, 1406-1418.
- Fujioka, S., and Yokota, T. (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 137-164.
- Gallego-Bartolome, J., Minguet, E.G., Grau-Enguix, F., Abbas, M., Locascio, A., Thomas, S.G., Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2012). Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13446-13451.
- Gallego-Bartolome, J., Minguet, E.G., Marin, J.A., Prat, S., Blazquez, M.A., and Alabadi, D. (2010). Transcriptional diversification and functional conservation between DELLA proteins in *Arabidopsis*. *Mol Biol Evol* **27**, 1247-1256.
- Gampala, S.S., Kim, T.W., He, J.X., Tang, W., Deng, Z., Bai, M.Y., Guan, S., Lalonde, S., Sun, Y., Gendron, J.M., *et al.* (2007). An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Dev Cell* **13**, 177-189.
- Gao, X.H., Xiao, S.L., Yao, Q.F., Wang, Y.J., and Fu, X.D. (2011). An updated GA signaling 'relief of repression' regulatory model. *Mol Plant* **4**, 601-606.
- Geldner, N., Hyman, D.L., Wang, X., Schumacher, K., and Chory, J. (2007). Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes Dev* **21**, 1598-1602.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., *et al.* (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J* **55**, 526-542.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2004). Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**, 1555-1573.
- Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S., and Yoshida, S. (2002). Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**, 1319-1334.

- Gou, X., Yin, H., He, K., Du, J., Yi, J., Xu, S., Lin, H., Clouse, S.D., and Li, J. (2012). Genetic evidence for an indispensable role of somatic embryogenesis receptor kinases in brassinosteroid signaling. *PLoS Genet* 8, e1002452.
- Griffiths, J., Murase, K., Rieu, I., Zentella, R., Zhang, Z.L., Powers, S.J., Gong, F., Phillips, A.L., Hedden, P., Sun, T.P., *et al.* (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 3399-3414.
- Grove, M.D.S., G. F.; Rohwedder, W. K.; Mandava, N.; Worley, J. F.; Warthen, J. D.; Steffens, G. L.; Flippen-Anderson, J. L. and Cook, J. C. (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281, 216-217.
- Gruszka, D. (2013). The brassinosteroid signaling pathway-new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. *Int J Mol Sci* 14, 8740-8774.
- Harberd, N.P., Belfield, E., and Yasumura, Y. (2009). The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments. *Plant Cell* 21, 1328-1339.
- Hauvermale, A.L., Ariizumi, T., and Steber, C.M. (2012). Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiol* 160, 83-92.
- He, J.X., Gendron, J.M., Sun, Y., Gampala, S.S., Gendron, N., Sun, C.Q., and Wang, Z.Y. (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307, 1634-1638.
- He, J.X., Gendron, J.M., Yang, Y., Li, J., and Wang, Z.Y. (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10185-10190.
- Heijde, M., and Ulm, R. (2012). UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci* 17, 230-237.
- Heilmann, M., and Jenkins, G.I. (2013). Rapid reversion from monomer to dimer regenerates the ultraviolet-B photoreceptor UV RESISTANCE LOCUS8 in intact *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* 161, 547-555.
- Hofgen, Z.W. (1990). Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato. *Plant Sci* 66, 221-230.
- Hong, G.J., Xue, X.Y., Mao, Y.B., Wang, L.J., and Chen, X.Y. (2012). *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell* 24, 2635-2648.
- Hornitschek, P., Kohnen, M.V., Lorrain, S., Rougemont, J., Ljung, K., Lopez-Vidriero, I., Franco-Zorrilla, J.M., Solano, R., Trevisan, M., Pradervand, S., *et al.* (2012). Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant J* 71, 699-711.
- Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O., and Fankhauser, C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *Embo J* 28, 3893-3902.
- Hothorn, M., Belkhadir, Y., Dreux, M., Dabi, T., Noel, J.P., Wilson, I.A., and Chory, J. (2011). Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* 474, 467-471.
- Hou, X., Lee, L.Y., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* 19, 884-894.

- Hu, W., Franklin, K.A., Sharrock, R.A., Jones, M.A., Harmer, S.L., and Lagarias, J.C. (2013). Unanticipated regulatory roles for *Arabidopsis* phytochromes revealed by null mutant analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 1542-1547.
- Huq, E., Al-Sady, B., Hudson, M., Kim, C., Apel, K., and Quail, P.H. (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science* **305**, 1937-1941.
- Huq, E., and Quail, P.H. (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *Embo J* **21**, 2441-2450.
- Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., and Yamaguchi, J. (2001). slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell* **13**, 999-1010.
- Irani, N.G., Di Rubbo, S., Mylre, E., Van den Begin, J., Schneider-Pizon, J., Hnilikova, J., Sisa, M., Buyst, D., Vilarrasa-Blasi, J., Szatmari, A.M., *et al.* (2012). Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane. *Nat Chem Biol* **8**, 583-589.
- Ito, S., Song, Y.H., and Imaizumi, T. (2012). LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **5**, 573-582.
- Jaillais, Y., Hothorn, M., Belkhadir, Y., Dabi, T., Nimchuk, Z.L., Meyerowitz, E.M., and Chory, J. (2011). Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev* **25**, 232-237.
- Jaillais, Y., and Vert, G. (2012). Brassinosteroids, gibberellins and light-mediated signalling are the three-way controls of plant sprouting. *Nat Cell Biol* **14**, 788-790.
- Jang, I.C., Henriques, R., Seo, H.S., Nagatani, A., and Chua, N.H. (2010). *Arabidopsis* PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. *Plant Cell* **22**, 2370-2383.
- Jarillo, J.A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Cashmore, A.R. (2001). Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* **410**, 952-954.
- Josse, E.M., Gan, Y., Bou-Torrent, J., Stewart, K.L., Gilday, A.D., Jeffree, C.E., Vaistij, F.E., Martinez-Garcia, J.F., Nagy, F., Graham, I.A., *et al.* (2011). A DELLA in disguise: SPATULA restrains the growth of the developing *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* **23**, 1337-1351.
- Kagawa, T., Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K., and Wada, M. (2001). *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**, 2138-2141.
- Kahook, M.Y., Liu, L., Ruzyski, P., Mandava, N., Carpenter, J.F., Petrash, J.M., and Ammar, D.A. (2010). High-molecular-weight aggregates in repackaged bevacizumab. *Retina* **30**, 887-892.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., and Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol* **91**, 29-66.
- Kaschani, F., and van der Hoorn, R. (2007). Small molecule approaches in plants. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 88-98.
- Khanna, R., Huq, E., Kikis, E.A., Al-Sady, B., Lanzatella, C., and Quail, P.H. (2004). A novel molecular recognition motif necessary for targeting photoactivated phytochrome signaling to specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Cell* **16**, 3033-3044.

- Khanna, R., Shen, Y., Marion, C.M., Tsuchisaka, A., Theologis, A., Schafer, E., and Quail, P.H. (2007). The basic helix-loop-helix transcription factor PIF5 acts on ethylene biosynthesis and phytochrome signaling by distinct mechanisms. *Plant Cell* 19, 3915-3929.
- Kim, T.W., Guan, S., Burlingame, A.L., and Wang, Z.Y. (2011). The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Mol Cell* 43, 561-571.
- Kim, T.W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J.X., Burlingame, A.L., and Wang, Z.Y. (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol* 11, 1254-1260.
- Kim, T.W., and Wang, Z.Y. (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 61, 681-704.
- King, K.E., Moritz, T., and Harberd, N.P. (2001). Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* 159, 767-776.
- Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S., and Chory, J. (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433, 167-171.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., and Shimazaki, K. (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414, 656-660.
- Kircher, S., Kozma-Bognar, L., Kim, L., Adam, E., Harter, K., Schafer, E., and Nagy, F. (1999). Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* 11, 1445-1456.
- Koini, M.A., Alvey, L., Allen, T., Tilley, C.A., Harberd, N.P., Whitelam, G.C., and Franklin, K.A. (2009). High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Curr Biol* 19, 408-413.
- Koornneef, M., A. Elgersma, C. J. Hanhart, E. P. van Loenen-Martinet, L. van Rijn, J. A. D. Zeevaart (1985). A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 65, 33-39.
- Kwon, M.a.C., S (2005). Brassinosteroid biosynthesis and dwarf mutants. *Journal of Plants Biology* 48, 1-15.
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo, J., Harberd, N.P., and Peng, J. (2002). Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev* 16, 646-658.
- Leivar, P., Monte, E., Al-Sady, B., Carle, C., Storer, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Quail, P.H. (2008). The *Arabidopsis* phytochrome-interacting factor PIF7, together with PIF3 and PIF4, regulates responses to prolonged red light by modulating phyB levels. *Plant Cell* 20, 337-352.
- Leivar, P., and Quail, P.H. (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci* 16, 19-28.
- Leivar, P., Tepperman, J.M., Monte, E., Calderon, R.H., Liu, T.L., and Quail, P.H. (2009). Definition of early transcriptional circuitry involved in light-induced reversal of PIF-imposed repression of photomorphogenesis in young *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 21, 3535-3553.
- Li, J., and Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90, 929-938.
- Li, J., Li, G., Wang, H., and Wang Deng, X. (2011). Phytochrome signaling mechanisms. *Arabidopsis Book* 9, e0148.

BIBLIOGRAFÍA

- Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C., and Chory, J. (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272, 398-401.
- Li, J., and Nam, K.H. (2002). Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 295, 1299-1301.
- Li, J., Nam, K.H., Vafeados, D., and Chory, J. (2001). BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127, 14-22.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., and Walker, J.C. (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110, 213-222.
- Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R.J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., Cole, B.J., Ivans, L.J., Pedmale, U.V., Jung, H.S., *et al.* (2012a). Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes Dev* 26, 785-790.
- Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R.J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., Cole, B.J., Ivans, L.J., Pedmale, U.V., Jung, H.S., *et al.* (2012b). Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes Dev* 26, 785-790.
- Li, Q.F., Wang, C., Jiang, L., Li, S., Sun, S.S., and He, J.X. (2012c). An interaction between BZR1 and DELLAs mediates direct signaling crosstalk between brassinosteroids and gibberellins in *Arabidopsis*. *Sci Signal* 5, ra72.
- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., and Lin, C. (2011). The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends Plant Sci* 16, 684-691.
- Liu, L., Zhang, Y., Tang, S., Zhao, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Dong, L., Guo, H., and Xie, Q. (2010). An efficient system to detect protein ubiquitination by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* 61, 893-903.
- Luo, X.M., Lin, W.H., Zhu, S., Zhu, J.Y., Sun, Y., Fan, X.Y., Cheng, M., Hao, Y., Oh, E., Tian, M., *et al.* (2010). Integration of light- and brassinosteroid-signaling pathways by a GATA transcription factor in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 19, 872-883.
- Mandava, N. (1988). Plant Growth-Promoting Brassinosteroids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39, 23-52.
- Martinez-Garcia, J.F., Huq, E., and Quail, P.H. (2000). Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* 288, 859-863.
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.P., and Steber, C.M. (2003). The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* 15, 1120-1130.
- Michael, T.P., Breton, G., Hazen, S.P., Priest, H., Mockler, T.C., Kay, S.A., and Chory, J. (2008). A morning-specific phytohormone gene expression program underlying rhythmic plant growth. *PLoS Biol* 6, e225.
- Michaels, S.D., and Amasino, R.M. (1999). The gibberellic acid biosynthesis mutant *ga1-3* of *Arabidopsis thaliana* is responsive to vernalization. *Dev Genet* 25, 194-198.
- Min, Y.K., Asami, T., Fujioka, S., Murofushi, N., Yamaguchi, I., and Yoshida, S. (1999). New lead compounds for brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 9, 425-430.
- Monte, E., Tepperman, J.M., Al-Sady, B., Kaczorowski, K.A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Li, X., Zhang, Y., and Quail, P.H. (2004). The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16091-16098.

- Mora-Garcia, S., Vert, G., Yin, Y., Cano-Delgado, A., Cheong, H., and Chory, J. (2004). Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18, 448-460.
- Nagata, N., Min, Y.K., Nakano, T., Asami, T., and Yoshida, S. (2000). Treatment of dark-grown *Arabidopsis thaliana* with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants. *Planta* 211, 781-790.
- Nagatani, A. (2010). Phytochrome: structural basis for its functions. *Curr Opin Plant Biol* 13, 565-570.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007a). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104, 34-41.
- Nakagawa, T., Suzuki, T., Murata, S., Nakamura, S., Hino, T., Maeo, K., Tabata, R., Kawai, T., Tanaka, K., Niwa, Y., *et al.* (2007b). Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 2095-2100.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S., Kobayashi, M., *et al.* (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J* 46, 880-889.
- Nam, K.H., and Li, J. (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110, 203-212.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126, 467-475.
- Nemhauser, J.L., Mockler, T.C., and Chory, J. (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 2, E258.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and Quail, P.H. (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* 95, 657-667.
- Ni, W., Xu, S.L., Chalkley, R.J., Pham, T.N., Guan, S., Maltby, D.A., Burlingame, A.L., Wang, Z.Y., and Quail, P.H. (2013). Multisite light-induced phosphorylation of the transcription factor PIF3 is necessary for both its rapid degradation and concomitant negative feedback modulation of photoreceptor phyB levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 2679-2698.
- Nozue, K., Covington, M.F., Duek, P.D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S.L., and Maloof, J.N. (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448, 358-361.
- Nozue, K., and Maloof, J.N. (2006). Diurnal regulation of plant growth. *Plant Cell Environ* 29, 396-408.
- Nusinow, D.A., Helfer, A., Hamilton, E.E., King, J.J., Imaizumi, T., Schultz, T.F., Farre, E.M., and Kay, S.A. (2011). The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475, 398-402.
- Ogawa, M., Kusano, T., Katsumi, M., and Sano, H. (2000). Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene* 245, 21-29.
- Oh, E., Kim, J., Park, E., Kim, J.I., Kang, C., and Choi, G. (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16, 3045-3058.

- Oh, E., Zhu, J.Y., and Wang, Z.Y. (2012). Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol* 14, 802-809.
- Olszewski, N., Sun, T.P., and Gubler, F. (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14 *Suppl*, S61-80.
- Park, E., Park, J., Kim, J., Nagatani, A., Lagarias, J.C., and Choi, G. (2012). Phytochrome B inhibits binding of phytochrome-interacting factors to their target promoters. *Plant J* 72, 537-546.
- Peng, J.C., P.; Richards, D. E.; King, K. E.; Cowling, R. J.; Murphy, G. P.; Harberd, N. P. (1997). The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev* 11, 3194-3205.
- Peng, P., Yan, Z., Zhu, Y., and Li, J. (2008). Regulation of the Arabidopsis GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation. *Mol Plant* 1, 338-346.
- Peng, P., Zhao, J., Zhu, Y., Asami, T., and Li, J. (2010). A direct docking mechanism for a plant GSK3-like kinase to phosphorylate its substrates. *J Biol Chem* 285, 24646-24653.
- Quail, P.H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 85-93.
- Rademacher, W. (2000). GROWTH RETARDANTS: Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51, 501-531.
- Reed, J.W., Nagpal, P., Poole, D.S., Furuya, M., and Chory, J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *Plant Cell* 5, 147-157.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schafer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., *et al.* (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 332, 103-106.
- Rockwell, N.C., Su, Y.S., and Lagarias, J.C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57, 837-858.
- Russinova, E., Borst, J.W., Kwaaitaal, M., Cano-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J., and de Vries, S.C. (2004). Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* 16, 3216-3229.
- Ryu, H., Cho, H., Kim, K., and Hwang, I. (2010). Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. *Mol Cells* 29, 283-290.
- Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S., and Hwang, I. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Cell* 19, 2749-2762.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., and Okada, K. (2001). Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6969-6974.
- Salchert, K., Bhalerao, R., Koncz-Kalman, Z., and Koncz, C. (1998). Control of cell elongation and stress responses by steroid hormones and carbon catabolic repression in plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353, 1517-1520.
- Schwechheimer, C. (2008). Understanding gibberellic acid signaling--are we there yet? *Curr Opin Plant Biol* 11, 9-15.
- Sharrock, R.A., and Clack, T. (2002). Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. *Plant Physiol* 130, 442-456.

- Sharrock, R.A., and Clack, T. (2004). Heterodimerization of type II phytochromes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 11500-11505.
- She, J., Han, Z., Kim, T.W., Wang, J., Cheng, W., Chang, J., Shi, S., Yang, M., Wang, Z.Y., and Chai, J. (2011). Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* *474*, 472-476.
- Shen, H., Moon, J., and Huq, E. (2005). PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize photomorphogenesis of seedlings in Arabidopsis. *Plant J* *44*, 1023-1035.
- Shen, H., Zhu, L., Castillon, A., Majee, M., Downie, B., and Huq, E. (2008). Light-induced phosphorylation and degradation of the negative regulator PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR1 from Arabidopsis depend upon its direct physical interactions with photoactivated phytochromes. *Plant Cell* *20*, 1586-1602.
- Shiu, S.H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y.H., Mayer, K.F., and Li, W.H. (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *Plant Cell* *16*, 1220-1234.
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N., and Sun, T. (1998). The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell* *10*, 155-169.
- Smyth, G.K., and Speed, T. (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods* *31*, 265-273.
- Steber, C.M., and McCourt, P. (2001). A role for brassinosteroids in germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* *125*, 763-769.
- Strasser, B., Sanchez-Lamas, M., Yanovsky, M.J., Casal, J.J., and Cerdan, P.D. (2010). Arabidopsis thaliana life without phytochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 4776-4781.
- Sullivan, J.A., and Deng, X.W. (2003). From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Dev Biol* *260*, 289-297.
- Sun, T.P. (2010). Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiol* *154*, 567-570.
- Sun, T.P. (2011). The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol* *21*, R338-345.
- Sun, X., Jones, W.T., and Rikkerink, E.H. (2012). GRAS proteins: the versatile roles of intrinsically disordered proteins in plant signalling. *Biochem J* *442*, 1-12.
- Sun, Y., Fan, X.Y., Cao, D.M., Tang, W., He, K., Zhu, J.Y., He, J.X., Bai, M.Y., Zhu, S., Oh, E., *et al.* (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev Cell* *19*, 765-777.
- Szekeres, M., Nemeth, K., Koncz-Kalman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Redei, G.P., Nagy, F., Schell, J., and Koncz, C. (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell* *85*, 171-182.
- Tanaka, k.N., Y.; Asami, T.; Yoshida, S.; Matsuso, T.; Okamoto, S. (2003). Physiological roles of brassinosteroids in early growth of Arabidopsis: brassinosteroids have a synergistic relationship with gibberellin as well as auxin in light-grown hypocotyl elongation. *J Plant Growth Regul* *22*, 259-271.
- Tang, W., Deng, Z., Oses-Prieto, J.A., Suzuki, N., Zhu, S., Zhang, X., Burlingame, A.L., and Wang, Z.Y. (2008). Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional DIGE. *Mol Cell Proteomics* *7*, 728-738.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Oses-Prieto, J.A., Kim, T.W., Zhou, H.W., Deng, Z., Gampala, S.S., *et al.* (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* *13*, 124-131.

- ter Haar, E., Coll, J.T., Austen, D.A., Hsiao, H.M., Swenson, L., and Jain, J. (2001). Structure of GSK3 β reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nat Struct Biol* 8, 593-596.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Quail, P.H. (2003). The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15, 1749-1770.
- Tyler, L., Thomas, S.G., Hu, J., Dill, A., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Sun, T.P. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in Arabidopsis. *Plant Physiol* 135, 1008-1019.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.Y., Hsing, Y.I., Kitano, H., Yamaguchi, I., *et al.* (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437, 693-698.
- Ueguchi-Tanaka, M., Nakajima, M., Katoh, E., Ohmiya, H., Asano, K., Saji, S., Hongyu, X., Ashikari, M., Kitano, H., Yamaguchi, I., *et al.* (2007). Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin. *Plant Cell* 19, 2140-2155.
- Ulijasz, A.T., Cornilescu, G., Cornilescu, C.C., Zhang, J., Rivera, M., Markley, J.L., and Vierstra, R.D. (2010). Structural basis for the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form. *Nature* 463, 250-254.
- Van Buskirk, E.K., Decker, P.V., and Chen, M. (2012). Photobodies in light signaling. *Plant Physiol* 158, 52-60.
- Vert, G., and Chory, J. (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 441, 96-100.
- Vert, G., Nemhauser, J.L., Geldner, N., Hong, F., and Chory, J. (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 177-201.
- Voinnet, O., Pinto, Y.M., and Baulcombe, D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14147-14152.
- Wang, H., Ma, L.G., Li, J.M., Zhao, H.Y., and Deng, X.W. (2001a). Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* 294, 154-158.
- Wang, H., Yang, C., Zhang, C., Wang, N., Lu, D., Wang, J., Zhang, S., Wang, Z.X., Ma, H., and Wang, X. (2011). Dual role of BKT1 and 14-3-3 s in brassinosteroid signaling to link receptor with transcription factors. *Dev Cell* 21, 825-834.
- Wang, X., and Chory, J. (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKT1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* 313, 1118-1122.
- Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M.B., Huber, S.C., and Clouse, S.D. (2008). Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell* 15, 220-235.
- Wang, Z.Y., Bai, M.Y., Oh, E., and Zhu, J.Y. (2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu Rev Genet* 46, 701-724.
- Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., *et al.* (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* 2, 505-513.
- Wang, Z.Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., and Chory, J. (2001b). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410, 380-383.
- Wild, M., Daviere, J.M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., and Achard, P. (2012). The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. *Plant Cell* 24, 3307-3319.

- Willige, B.C., Ghosh, S., Nill, C., Zourelidou, M., Dohmann, E.M., Maier, A., and Schwechheimer, C. (2007). The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 1209-1220.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. (1989). Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17, 3469-3478.
- Woodgett, J.R. (2001). Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci STKE* 2001, re12.
- Wu, D., and Pan, W. (2010). GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci* 35, 161-168.
- Xu, W., Purugganan, M.M., Polisensky, D.H., Antosiewicz, D.M., Fry, S.C., and Braam, J. (1995). Arabidopsis TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* 7, 1555-1567.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S.A., and Nagatani, A. (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic Arabidopsis. *J Cell Biol* 145, 437-445.
- Yamaguchi, S., Smith, M.W., Brown, R.G., Kamiya, Y., and Sun, T. (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 10, 2115-2126.
- Yamashino, T., Nomoto, Y., Lorrain, S., Miyachi, M., Ito, S., Nakamichi, N., Fankhauser, C., and Mizuno, T. (2013). Verification at the protein level of the PIF4-mediated external coincidence model for the temperature-adaptive photoperiodic control of plant growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Signal Behav* 8, e23390.
- Yan, Z., Zhao, J., Peng, P., Chihara, R.K., and Li, J. (2009). BIN2 functions redundantly with other Arabidopsis GSK3-like kinases to regulate brassinosteroid signaling. *Plant Physiol* 150, 710-721.
- Yang, C.J., Zhang, C., Lu, Y.N., Jin, J.Q., and Wang, X.L. (2011). The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development. *Mol Plant* 4, 588-600.
- Yang, D.L., Yao, J., Mei, C.S., Tong, X.H., Zeng, L.J., Li, Q., Xiao, L.T., Sun, T.P., Li, J., Deng, X.W., *et al.* (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1192-1200.
- Yang, H.Q., Tang, R.H., and Cashmore, A.R. (2001). The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* 13, 2573-2587.
- Yang, H.Q., Wu, Y.J., Tang, R.H., Liu, D., Liu, Y., and Cashmore, A.R. (2000). The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* 103, 815-827.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* 120, 249-259.
- Yin, Y., Wang, Z.Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109, 181-191.
- Yu, S., Galvao, V.C., Zhang, Y.C., Horrer, D., Zhang, T.Q., Hao, Y.H., Feng, Y.Q., Wang, S., Schmid, M., and Wang, J.W. (2012). Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. *Plant Cell* 24, 3320-3332.

- Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., Guo, H., Anderson, S., Aluru, S., Liu, P., *et al.* (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 65, 634-646.
- Yu, X., Liu, H., Klejnot, J., and Lin, C. (2010). The Cryptochrome Blue Light Receptors. *Arabidopsis Book* 8, e0135.
- Zhang, Y., Mayba, O., Pfeiffer, A., Shi, H., Tepperman, J.M., Speed, T.P., and Quail, P.H. (2013). A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 9, e1003244.
- Zhang, Z.L., Ogawa, M., Fleet, C.M., Zentella, R., Hu, J., Heo, J.O., Lim, J., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Sun, T.P. (2011). Scarecrow-like 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2160-2165.
- Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R.J., Decker, A.D., Tax, F.E., and Li, J. (2002). Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol* 130, 1221-1229.
- Zhu, J.Y., Sae-Seaw, J., and Wang, Z.Y. (2013). Brassinosteroid signalling. *Development* 140, 1615-1620.
- Zurek, D.M., and Clouse, S.D. (1994). Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls. *Plant Physiol* 104, 161-170.